



Etude de la migration du corps basal au cours de la ciliogénèse

Amandine Pitaval

► To cite this version:

Amandine Pitaval. Etude de la migration du corps basal au cours de la ciliogénèse. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. <NNT : 2016GREAV001>. <tel-01318967>

HAL Id: tel-01318967

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01318967>

Submitted on 20 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Amandine PITAVAL

Thèse dirigée par **Manuel THERY**

Co-dirigée par **Xavier GIDROL**

Co-encadrée par James **SILLIBOURNE**

préparée au sein des **Laboratoire CEA/BIG/BIOMICS et
CEA/BIG/Cytomorpholab**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de la migration du corps basal au cours de la ciliogénèse

Thèse soutenue publiquement **5 Février 2016**
devant le jury composé de :

Mme Bénédicte DURAND

Professeur, Université Claude Bernard Lyon-1, Rapporteur

Mr Philippe BASTIN

Directeur de recherche, INSERM Paris, Rapporteur

Mme Annie ANDRIEUX

Directeur de recherche, CEA UJF GIN Grenoble, Examineur

Mme Juliette AZIMZADEH

Chargée de recherche, CNRS, Paris, Examineur

Mr Alexandre BENMERAH

Directeur de recherche INSERM, Paris, Examineur et Président du jury

Mr Manuel THERY

Docteur CEA, Paris, directeur de thèse

Mr Xavier GIDROL

Docteur CEA, Grenoble, co-directeur de thèse

Mr James SILLIBOURNE

Docteur CEA, Paris, co-encadrant



TABLE DES MATIERES DETAILLEE

INTRODUCTION	13
I. Le cil primaire : une antenne sensorielle à la surface cellulaire	15
1. Composition du cil primaire.....	15
A. Ultrastructure	15
B. Système de transport intraflagellaire	17
a. <i>Les particules IFT</i>	17
b. <i>Les protéines accessoires du complexe IFT</i>	19
2. Les multiples fonctions exercées par le cil primaire	19
3. Contrôle transcriptionnel de gènes régulant la ciliogénèse.....	21
4. Les ciliopathies	22
5. Acteur dans l'équilibre prolifération-différenciation.....	25
A. Coordination de la ciliogénèse et de la duplication du centrosome avec le cycle cellulaire	25
B. Régulation réciproque entre ciliogénèse et cycle cellulaire	26
a. <i>Des protéines du cycle cellulaire contrôlent la ciliogénèse</i>	26
b. <i>Des protéines du cil ou du corps basal régulent la prolifération</i>	28
C. Déséquilibre de la balance prolifération/différenciation	29
a. <i>Cas de la polykystose rénale</i>	29
b. <i>Cil et cancer</i>	30
II. La ciliogénèse : succession d'évènements coordonnés menant à la formation du cil primaire.....	33
1. Différenciation du centriole père en corps basal	34
A. Formation des appendices distaux / fibres de transition.....	34
a. <i>Assemblage</i>	34
b. <i>Composition moléculaire</i>	35
c. <i>Fonctions des appendices distaux/fibres de transition</i>	36
B. Formation des appendices subdistaux/pieds basaux.....	36
a. <i>Assemblage</i>	36
b. <i>Composition moléculaire</i>	37
c. <i>Fonctions des appendices subdistaux</i>	37
C. Levée d'inhibition du programme ciliogénique : rôle de CP110	38
D. Association du corps basal avec la vésicule ciliaire	40
E. Formation de la zone de transition et d'une partie de l'axonème au sein de la vésicule.....	41
a. <i>Assemblage de la zone de transition</i>	41
b. <i>Extension de l'axonème couplée à celle de la vésicule ciliaire</i>	41
2. Trafic polarisé vers la base du cil	42
A. Trafic vésiculaire polarisé de l'appareil de Golgi/endosomes de recyclage vers la base du cil	43
a. <i>Les vésicules Rab8/Rab11</i>	43
b. <i>Rôle des protéines IFT</i>	44
B. Les microtubules impliqués dans le trafic de protéines cytosoliques	44
C. Le BBSome, à l'interface de ces différents modes de trafic	45
3. La barrière ciliaire.....	46

A.	Rôle des fibres de transition	47
B.	Rôle de la zone de transition.....	48
C.	Rôle des modules NPHP et MKS/JTBS dans la barrière ciliaire.....	48
D.	La poche ciliaire	48
III.	Forces exercées par le cytosquelette pour le positionnement du centrosome.....	51
1.	Le centrosome : un organe connecté	51
A.	Connexion du centrosome avec le cytosquelette.....	51
B.	Connexion du centrosome avec d'autres organites intracellulaires	52
a.	Connexion avec le noyau	53
b.	Connexion avec l'appareil de Golgi.....	54
2.	Repositionnement du centrosome lors de polarisation cellulaire	55
A.	Polarité cellulaire: définition	55
B.	Polarisation du centrosome dans différents contextes cellulaires	56
a.	Cas de la division cellulaire.....	57
b.	Cas de la migration cellulaire	57
c.	Cas de la formation d'une synapse immunologique.....	58
3.	Mécanismes impliqués dans le centrage et le décentrage du centrosome	59
A.	Différentes forces appliquées au centrosome	59
a.	Forces exercées par les microtubules	60
b.	Forces dépendantes de l'actine et de la myosine	64
B.	Signaux de polarité sous jacents au positionnement du centrosome	66
a.	Le cortex cellulaire, les protéines ERM	66
b.	Les protéines PAR.....	67
c.	Cdc42 au coeur de la polarité.....	69
d.	Cdc42, RhoA et Rac dans la formation des différents types de structures d'actine.....	70
e.	Signaux extrinsèques	70
C.	Mécanismes impliqués dans les forces agissant sur la polarisation du centrosome	71
a.	Principes généraux	71
b.	Cas de la mitose.....	72
c.	Cas de la migration	74
d.	Cas de la formation de la synapse immunologique	76
PROBLEMATIQUE		79
I.	Modification de l'organisation et de la dynamique du cytosquelette lors de la polarisation d'une cellule épithéliale	81
II.	Le cytosquelette d'actine est impliqué dans la migration du centrosome lors de la ciliogénèse	82
1.	Cas de la multiciliogénèse	82
2.	Cas de la formation du cil primaire	83
A.	Facteurs régulant un changement d'organisation de l'actine lors de la ciliogénèse.....	83
B.	Facteurs régulant la migration la migration du corps basal durant la migration du corps basal dans les cellules ciliées	84
III.	Réorganisation du réseau de microtubules lors de la ciliogénèse	85

RESULTATS ET DISCUSSIONS	87
I. La forme et la contractilité cellulaire régule la ciliogénèse.....	89
1. Introduction à l'article	89
2. Article.....	90
3. Conclusions générales	106
4. Discussions et perspectives.....	106
A. Le confinement spatial et le devenir cellulaire	106
B. Confinement spatial, remodelage de l'actine et mécanotransduction.....	107
C. Rôle complexe du cytosquelette d'actine sur les deux étapes de la ciliogénèse : migration du centrosome et élongation du cil.....	108
D. Polarisation d'une cellule unique dépourvue de contact cellule/cellule.....	110
E. Rôle du réseau de microtubules dans la ciliogénèse?	111
II. Rôle de la stabilisation du réseau de microtubules dans la migration du corps basal lors de la ciliogénèse.....	113
1. Introduction à l'article	113
2. Article en préparation.....	117
3. Conclusions générales	153
4. Discussions et perspectives.....	154
A. Migration du corps basal et réorganisation du réseau de microtubules	155
B. Les forces de traction exercées sur le corps basal.....	159
C. Migration du corps basal et réorganisation du cytosquelette d'actine.....	159
D. Dialogue entre le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules.....	160
E. Effet de la privation de sérum.....	161
F. Le crible ARN interférence	161
CONCLUSIONS ET PERPECTIVES	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167
ANNEXES	187
Article méthodologie	189
ABREVIATIONS	213

INTRODUCTION

I. Le cil primaire : une antenne sensorielle à la surface cellulaire

1. Composition du cil primaire

A. Ultrastructure

Chez les mammifères, il existe deux grandes catégories de cils : le cil primaire (ou cil unique) et les cils motiles. Le cil primaire, généralement immobile, est localisé à la surface de la quasi-totalité des cellules en quiescence telles que les cellules épithéliales de la rétine, du foie, des tubules rénaux, les cellules endothéliales, musculaires, les chondrocytes, les neurones. Il est doté de fonctions sensorielles. A l'inverse des cils primaires qui ne sont présents qu'en une copie unique, les cils motiles sont plus d'une centaine à recouvrir la surface des cellules épithéliales bronchiques, de l'épendyme tapissant les ventricules cérébraux ou encore des trompes de Fallope. Ils sont capables grâce à leur battement coordonné de générer un mouvement de fluide afin de permettre respectivement l'évacuation du mucus, la circulation du liquide céphalorachidien, ou encore le mouvement des ovocytes (Figure 1).

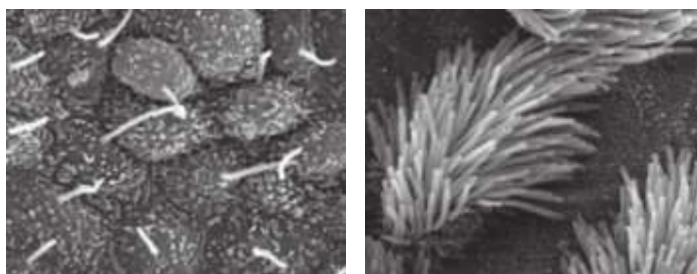


Figure 1 : Image de gauche : cil primaire présent au niveau du nœud nodal chez la souris.

Image de droite : cils motiles des cellules multiciliées de trachée chez la souris. Photos extraites de Ishikawa & Marshall (2011).

Le cil constitue un compartiment cellulaire bien individualisé, séparé du reste de la cellule. Qu'il soit motile ou sensoriel (unique), sa structure est extrêmement bien conservée. De structure cylindrique, il est constitué de trois parties distinctes : le **corps basal** (dérivé du centriole père) ancré à la membrane plasmique, l'**axonème** formant une projection externe à la cellule entouré de sa propre membrane et la **zone de transition**, se situant entre le corps basal et l'axonème. Le cil primaire est souvent partiellement externalisé, une poche ciliaire créée par une invagination membranaire est observée à proximité du corps basal (Figure 2).

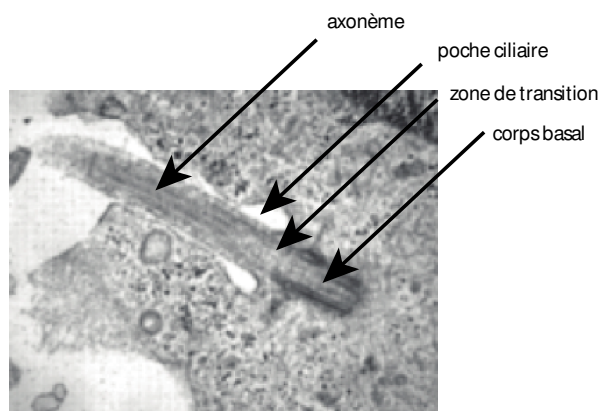


Figure 2 : Microscopie électronique du cil primaire dans les cellules hTERT-RPE1 Photo extraite de Molla-Herman et al. (2010).

L'**axonème** des cils primaires est composé de 9 doublets périphériques de microtubules (structure axonémale dite en « 9+0 »). Celui des cils mobiles est pourvu d'une paire centrale

supplémentaire de singulets de microtubules (structure axonémale dite en « 9+2 »). La présence de bras de dynéine entre les doublets de microtubules est nécessaire pour générer le mouvement des cils mobiles.

Il existe des exceptions à cette classification basée sur la structure axonémale des cils. A titre d'exemple, les cils du nœud embryonnaire de Hensen sont mobiles et déterminent de part leur battement coordonné, la mise en place de l'asymétrie droite/gauche de l'embryon. Ils sont pourtant pourvus d'une paire centrale de microtubules et sont donc de type « 9+0 ». A l'inverse, les cils de la cochlée de l'oreille interne appelés kinocils sont immobiles et pourtant de structure « 9+2 ». La composition microtubulaire de la pointe du cil se réduit en 9 singulets. Elle formerait une zone privilégiée pour la concentration de récepteurs ciliaires.

L'axonème est recouvert d'une membrane qui est en continuité avec celle de la membrane plasmique mais distincte en terme de composition phospholipidique et protéique. Dans la plupart des cellules, le cil n'est pas complètement externalisé, il reste partiellement intracellulaire, logé au fond d'une invagination membranaire. Une poche ciliaire est formée et se trouve à proximité du corps basal (Figure 2).

Le **corps basal**, formé de 9 triplets de microtubules périphériques, constitue la base du cil et sert de plateforme à la construction du cil. Ancré à la membrane plasmique, le corps basal provient de la maturation du centriole père, le centriole le plus âgé du centrosome. Le centriole immature ou centriole fils reste associé physiquement au centriole père et ces deux derniers sont reliés et entourés par une matrice péri-centriolaire (ou PCM : pericentriolar matrix). La différenciation du centriole père en corps basal a lieu pendant les phases précoces de la ciliogénèse dès lors que la cellule entre en phase G0. Durant cette étape, les appendices distaux et subdistaux - structures externes émanant de la périphérie du centriole père (au nombre de 9) - se spécialisent et se différencient grâce au recrutement de protéines afin d'apporter des fonctions spécifiques au corps basal lui permettant de former le cil.

De façon plus détaillée, les fibres de transition, localisées au niveau de la partie distale du corps basal, dérivent des appendices distaux du centriole père et servent à connecter les microtubules les plus externes du corps basal à la membrane. Elles jouent également un rôle actif dans le tri des protéines provenant du cytoplasme pouvant accéder à l'intérieur du cil et dans l'association de la vésicule ciliaire au corps basal (se référer au chapitre 2 pour plus de détails).

Au niveau de la partie proximale du corps basal, les pieds basaux, provenant de la modification des appendices subdistaux du centriole père. Ils permettent l'ancrage des microtubules cytoplasmiques à la base du cil. Enfin, le corps basal de certains cils sensoriels comme les photorécepteurs ou encore des cils motiles peut être pourvu d'une racine striée, se situant dans le prolongement de sa partie proximale. Son rôle reste encore énigmatique mais cette structure ne semble pas essentielle à l'assemblage ni même à la fonction du cil. En revanche, dans certains cas, elle fournit le support mécanique au cil.

Les fibres de transition marquent la frontière entre le corps basal et la **zone de transition**. Cette dernière se caractérise par la présence de projections en forme de Y connectant chacun des 9 doublets de la zone de transition à la membrane ciliaire avoisinante. Ces fibres organisent ainsi le « necklace » ou collier ciliaire, créant un site d'association fort entre les fibres et la membrane.

La zone de transition associée aux fibres de transition, constitue une véritable barrière physique entre le cil et le cytoplasme empêchant le passage libre des vésicules entre les deux compartiments. Par ailleurs la zone de transition constitue une zone de plateforme des

particules IFT qui seront ensuite assemblées et transloquées dans l'axonème (Reiter et al. 2012; Garcia-Gonzalo et al. 2011).

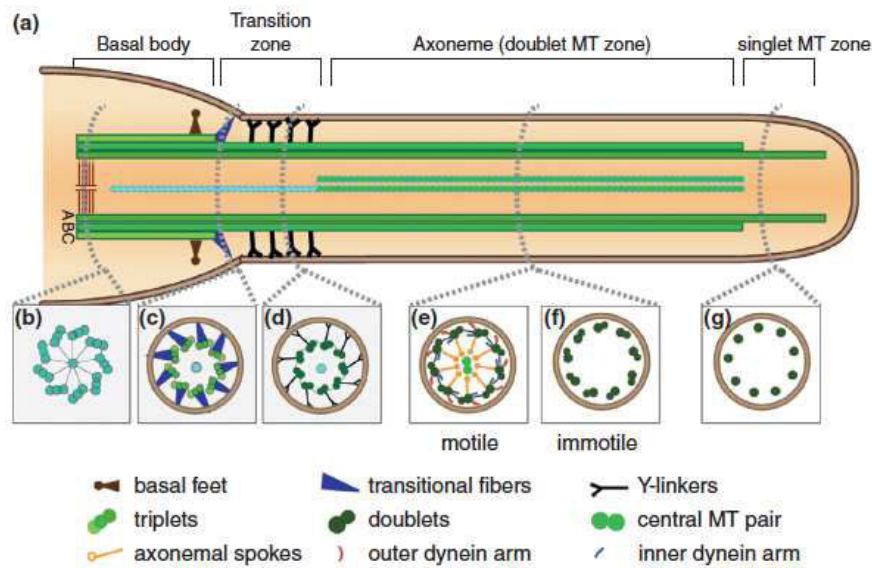


Figure 3 : Schéma représentant la structure du cil primaire et des cils motiles.

En haut : Vue longitudinale du cil primaire constitué de trois parties principales structurellement différentes : le corps basal ancré au niveau de la membrane plasmique, la zone de transition et l'axonème.

En bas : Coupes transversales des différentes parties du cil selon s'il est motile ou primaire.

Figure extraite de Jana et al. (2014)

B. Système de transport intraflagellaire

Le cil primaire est une organelle dynamique et transitoire, capable de s'assembler lors de l'entrée des cellules en quiescence mais aussi de se résorber suite à différents stimuli pouvant provenir de signaux mitogènes ordonnant à la cellule d'entrer en mitose. Un mécanisme doit donc être mis en place pour assurer ces processus d'assemblage et de désassemblage du cil, nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

a. Les particules IFT

Le cil n'étant pas capable de synthétiser ses propres protéines, son élongation ainsi que son renouvellement protéique nécessitent l'import sélectif et le transport de protéines cytoplasmiques jusqu'au sommet du cil. Synthétisées dans le cytoplasme et une fois localisées à la base du cil, elles sont acheminées le long des microtubules de l'axonème par un transport actif appelé transport intraflagellaire (IFT : Intra Flagellar Transport). Ce transport actif, mis en évidence pour la première fois au niveau du flagelle de l'algue verte *Chlamydomonas*, permet le mouvement bidirectionnel de complexes multiprotéiques (nommées trains IFT) le long des doublets périphériques de l'axonème (Kozminski et al. 1995). Ce transport est catalysé par des protéines motrices et se fait - soit par la kinésine 2, de la base du cil vers l'extrémité distale du cil (transport antérograde) - soit par la dynéine 2 cytoplasmique, de la pointe du cil vers la base du cil (transport rétrograde).

Les protéines composants ces IFT ont été identifiées et classées en deux sous complexes :

le complexe IFT-A (composé d'au moins 6 protéines connues) et le complexe IFT-B (composé d'au moins 14 protéines connues dont Ift20 et Ift88) (Figure 4). Le rôle des particules IFT ne se limite pas au transport intra-ciliaire. Lors de la croissance du cil, la membrane ciliaire se forme grâce à l'apport de membranes par des vésicules cytoplasmiques. Certaines protéines du complexe IFT-B, telles que Ift20 et Ift54 sont impliquées dans cette étape consistant en l'acheminement des vésicules membranaires de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane ciliaire (Follit et al. 2006; Ishikawa & Marshall 2011). D'autres protéines IFT localisées au niveau des fibres de transition interagissent fonctionnellement avec des composants de la zone de transition afin de charger les protéines cargos du cil nécessaires à la formation du cil (Ishikawa et al. 2005; Singla et al. 2010; Ishikawa & Marshall 2011). De plus, l'intégrité du système IFT est crucial pour assurer la régulation de la transduction de signaux à travers le cil (Goetz & Anderson 2010; Santos & Reiter 2008; Liem et al. 2012; Gerdes et al. 2009).

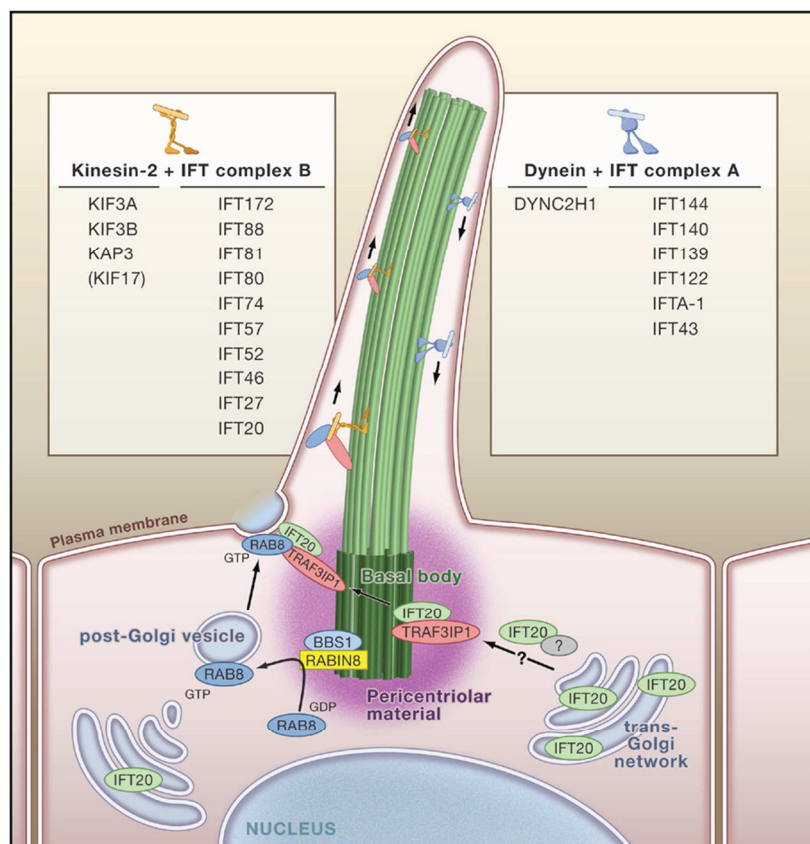


Figure 4 : Transport intraflagellaire bidirectionnel composé de complexes multiprotéiques associés à des moteurs moléculaires. Le complexe IFTB est associé à la kinésine-2 pour le transport antérograde et le complexe IFTA avec la dynéine-2 pour le transport rétrograde. Implication de Ift20 dans le transport de vésicules cytoplasmiques de l'appareil de Golgi jusqu'à la base du cil. Figure extraite de Gerdes et al. (2009).

Le système IFT assure donc l'assemblage et la résorption du cil (initié par un engagement des cellules en mitose par exemple) mais aussi le maintien de l'intégrité et de la longueur du cil. En effet, pour que le cil ait une fonction optimale, qu'elle soit motrice ou sensorielle, sa longueur doit rester constante une fois la croissance du cil achevée. De fait, un état d'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des sous unités de tubuline incorporées ou dissociées au niveau de la pointe cil doit être assuré. Ainsi, le système IFT reste actif et dynamique et régule la longueur du cil. Par exemple, la taille des cils motiles doit être

parfaitement adaptée à leur fonction motrice (ni trop longue, ni trop courte) afin de produire un type de battement défini et générer un mouvement de flux optimal. Concernant les cils sensoriels, ceci paraît moins clair mais il a été montré qu'une variation dans la longueur du cil pouvait affecter la fonction intrinsèque du cil, du fait d'une variation dans la concentration et de la distribution des composants ciliaires (Ishikawa & Marshall 2011).

b. Les protéines accessoires du complexe IFT

D'autres protéines accessoires du complexe IFT ont été identifiées pour leur rôle dans le transport intraflagellaire. C'est le cas de la protéine TULP3 (Tubby like protein 3). En interagissant directement avec le complexe IFT-A, elle permet la localisation de certains récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) au niveau de la membrane ciliaire (Mukhopadhyay et al. 2010). Par ailleurs, plusieurs études ont révélé l'association de certaines protéines du complexe multi-protéique BBSome avec les particules IFT (se référer au chapitre 2). Le BBSome, impliqué classiquement dans le trafic de vésicules jusqu'à la base ciliaire, contrôle aussi l'assemblage des particules IFT à la fois à la base et à la pointe du cil, et coordonne les particules IFT et les protéines motrices pour garantir un transport antérograde optimal. (Wei, Zhang, Ling, Hu 2012, Blacque 2004, Williams, Norris, Pei, Martens 2012).

2. Les multiples fonctions exercées par le cil primaire

Considéré depuis plus de cent ans comme un vestige ou comme une excroissance cellulaire insignifiante, le cil est depuis une quinzaine d'années sous les projecteurs et suscite un grand intérêt scientifique depuis notamment la découverte de l'implication du cil primaire dans le développement rénal (Gregory J Pazour et al. 2000).

Nous savons à présent que le cil primaire représente une véritable antenne cellulaire. Il est ancré à la surface de quasiment toutes les cellules de mammifères différenciées. En contact avec l'environnement extracellulaire, les nombreux récepteurs, canaux transmembranaires et autres molécules, concentrés sur la membrane des cils primaires captent les signaux de l'environnement extérieur pour les transmettre à l'intérieur de la cellule en initiant des cascades de signalisation. Le cil primaire est ainsi impliqué dans le développement embryonnaire et joue un rôle crucial dans de grandes fonctions cellulaires comme la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire, la transcription, la morphologie des tissus, l'organisation de la polarité etc. (Ezratty et al. 2011; Schneider et al. 2005; Tummala et al. 2010; Plotnikova et al. 2008; Blitzer et al. 2011).

Selon le type cellulaire, le cil a une fonction dédiée afin de répondre à un besoin spécifique inhérent à l'organe ou au tissu dans lequel il se trouve. La variété de formes, de longueurs et de compositions que l'on peut observer dans différents tissus témoigne de l'adaptation de la cellule à former un cil dédié, regroupant des récepteurs capables de réagir à différents types de stimuli. En effet, chez tous les mammifères, le cil primaire est une organelle sensorielle qui peut être dotée de capacité de mécanosensation, de chimiosensation et/ou de perception (lumière, odeurs, son).

Le cil est également au cœur de grandes voies de signalisation, jouant un rôle clé dans le développement et l'homéostasie tissulaire comme la voie Sonic Hedgehog (Shh), la voie Wnt / PCP (Planar Cell Polarity), PDGF. La liste des voies de signalisation modulée par le cil ne cesse de grandir. La voie Hippo, basée sur l'implication de kinases contrôlant la taille des organes et la

prolifération est régulée par une protéine ciliaire. D'autre part, des processus cellulaires comme la transition épithéliale mésenchymateuse, la différenciation des progéniteurs dans l'épiderme via Notch ou encore l'autophagie dépendent de la fonction du cil (Ezratty et al. 2011; Egorova et al. 2011; Pampliega et al. 2013).

Les membres de la famille Hedgehog contrôlent plusieurs étapes clés de l'embryogénèse comme la fermeture du tube neural, l'asymétrie droite/gauche, l'organisation du système nerveux, la formation des membres et des doigts. A l'état adulte, cette voie reste importante pour l'homéostasie des tissus et la prolifération cellulaire.

En 2003, Huangfu et collaborateurs font la découverte majeure de l'existence d'une connexion entre la voie Hedgehog et le système IFT du cil primaire, suite à un crible génétique avec des souris visant à observer le modelage des organes lors du développement embryonnaire. Ils identifient alors plusieurs mutants montrant notamment une anomalie de la fermeture du tube neural, conséquence d'une altération de la voie Hh. De façon inattendue, des gènes défectueux dans ces mutants codent des composants de la machinerie IFT, protéines essentielles à la formation du cil (Ift88, Ift172 et Kif3a) (Huangfu et al. 2003; Huangfu & Anderson 2005)(Huangfu et al. 2003; Huangfu & Anderson 2005). Des études ultérieures révèlent que le système IFT fait transiter le long de l'axonème et concentre de façon dynamique, les composants requis pour la réception et la transduction de l'activité de signalisation de la voie Hh (Michaud & Yoder 2006).

De façon plus détaillée, Shh est un ligand dédié à un récepteur membranaire ciliaire appelé Patched1 (Ptch1). En absence du ligand Shh, Ptch1 est localisé à la membrane ciliaire et maintient Smoothened (Smo) dans un état inactif.

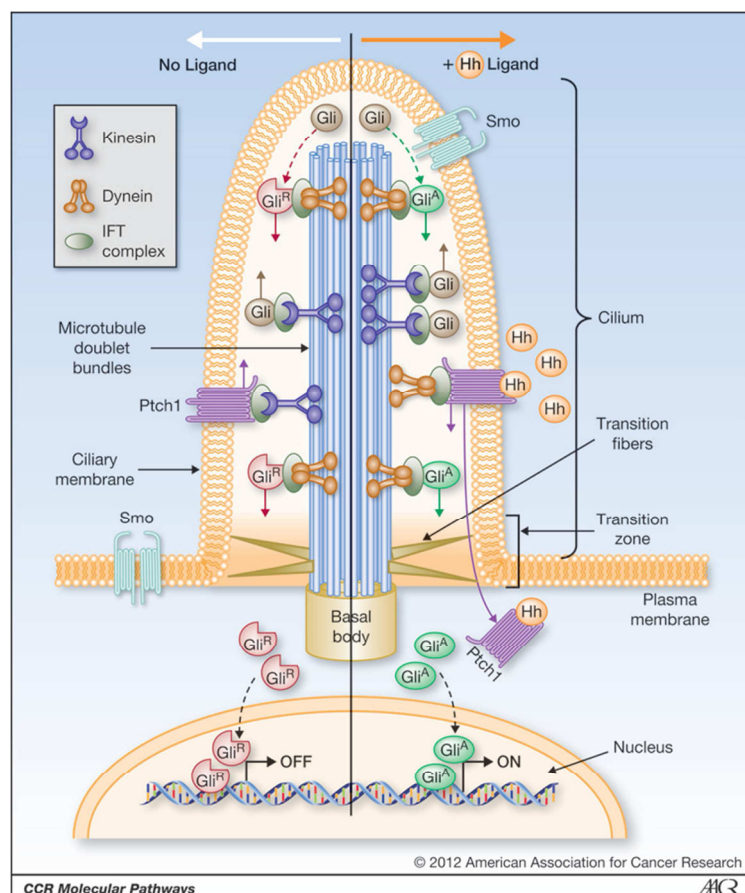


Figure 5: Modèle simplifié illustrant la régulation de la voie Hh par le cil primaire chez les mammifères.

En absence de Hh (partie gauche), la protéine Gli est convertie sous sa forme de répresseur (Gli^R). D'autre part, Ptch1 est localisé à la membrane ciliaire alors que Smo est à l'extérieur du compartiment ciliaire.

En présence de Hh (Partie droite), Gli est converti en activateur (Gli^A) pour être ensuite transloqué dans le noyau et activer l'expression de gènes cibles de Hh. Par ailleurs, Ptch1 s'extrait du compartiment ciliaire alors que Smo se déplace vers le cil pour activer la formation de l'état activateur de Gli (Gli^A).

Figure extraite de Hassounah et al. (2012).

Dans cette situation, le facteur de transcription nommé Gli3 subit des modifications post-traductionnelles ainsi qu'un clivage protéolytique et se comporte ainsi comme un répresseur transcriptionnel (Gli3^R). En présence du ligand Shh, la répression de Smo effectuée par Ptch1 est levée, induisant une relocalisation de Ptch1 à l'extérieur du cil et une migration et une concentration de Smo dans l'axonème. Le clivage protéolytique de Gli3 est inhibée et les protéines Gli subissent à leur tour une modification post-traductionnelle stimulant leur activité transcriptionnelle (Gli^A). Ces Gli activées vont par la suite entrer dans le noyau pour activer l'expression des gènes cibles de la voie Shh (Figure 5).

3. Contrôle transcriptionnel de gènes régulant la ciliogénèse

De même ultrastructure (le corps basal, zone de transition, l'axonème), les cils au sein même d'un même organisme se présentent pourtant sous différentes formes, tailles, peuvent être motiles ou immobiles, de structure axonémale « 9+0 » ou 9+2 », uniques ou multiples. Chaque groupe de cils est donc inhérent et adapté à la fonction biologique qu'il exerce, du générateur de mouvement de fluide aux fonctions sensorielles, en passant par la fertilité et la reproduction pour les cellules multiciliées. Par ailleurs, ces organelles sont complexes étant donné les centaines de composants requis pour l'assemblage de leur structure et leur fonction. On peut alors se demander quels sont les mécanismes développés par la cellule pour assurer la genèse de tous des sous-types de cils dans un temps restreint et spécifique à un tissu donné. La régulation de la transcription est un des mécanismes.

A ce titre, il a été identifié deux familles de facteurs de transcription **FoxJ1** (Forkhead box J1) et **RFX** (regulatory factor X) agissant dans le contrôle de l'expression de protéines spécifiques du cil, et par voie de conséquence, modulant le processus de ciliogénèse. FoxJ1 est spécifique de la formation du cil motile chez les vertébrés (poisson zèbre, xénope et souris) et régule de nombreux gènes structuraux de l'axonème impliqués dans la motilité. Quant à RFX, son rôle est plus étendu puisqu'il régule aussi bien l'assemblage des cils motiles qu'immobiles, de *C. elegans* aux mammifères. Ce facteur module le transport IFT en régulant à la fois l'expression de composants IFT-B, celle des protéines du BBSome coordonnant les particules IFT ainsi que celle des moteurs du transport rétrograde. Il contrôle également l'expression de quelques composants de la zone de transition (B9d1, B9d2, Tmem67/meckeline, Nphp1, Nphp4) (Thomas et al. 2010; Choksi et al. 2014).

Comment la cellule décide-t-elle de pousser à la surface d'un épithélium rénal un cil primaire sensible au flux urinaire plutôt qu'une panoplie de cils motiles inappropriés à la signalisation rénale? L'activation de gènes cibles déterminée pour la spécification de différents types de cils résulterait à la fois de la modification de ces programmes génétiques transcriptionnels par des facteurs de transcription spécifiques d'un type cellulaire donné et des voies de signalisation telles que Shh, Noto, Wnt, FGF (Fibroblast Growth Factor). Par exemple, chez les mammifères, le facteur de transcription HNF1β (hepatocyte nuclear factor 1β) a été caractérisé pour sa fonction de régulateur d'expression de gènes codant pour PKHD1 (polycystic kidney and hepatic disease 1) et PKD2 (polycystic kidney 2) suggérant son implication uniquement lors de la ciliogénèse au niveau de l'épithélium rénal (Thomas et al. 2010; Choksi et al. 2014).

D'autre part, de nombreuses voies de signalisation ont été décrites pour réguler FoxJ1 et RFX. A titre d'exemple, FoxJ1 serait sous le contrôle de Shh, NOTCH et NOTO (Notochord homeobox), cela dans différentes espèces et modèles cellulaires.

Par ailleurs, l'intervention de mécanismes de régulation post-transcriptionnels peut aussi expliquer la diversité des cils et leur spécification. Sont concernés notamment les modifications post-traductionnelles des composants ciliaires incluant la glutamylation, l'acétylation de la tubuline, et l'action des micro-ARN. Chez l'Homme et la souris, une mutation du miR-96 dans les cellules ciliées de l'oreille interne entraîne une déficience auditive, un des gènes cibles étant *Odf2*, une protéine du corps basal impliquée dans la formation du cil. Deux récentes publications révèlent le rôle de deux micro-ARN, miR-34/449 et miR-129-3p dans l'initiation de la ciliogénèse, elle même synchronisée avec le cycle cellulaire. Tous deux répriment CP110, une protéine centriolaire impliquée dans le blocage du programme ciliogénique favorisant ainsi la maturation du centriole père en corps basal (Song et al. 2014; Cao et al. 2012). Ces études représentent un premier pas vers la compréhension des événements géniques responsables de l'initiation de la ciliogénèse.

Tous ces exemples illustrent l'existence d'un contrôle subtil de l'expression génique lors de la ciliogénèse pouvant faire intervenir différents mécanismes complexes. Il reste beaucoup à découvrir à ce sujet car comprendre les mécanismes de régulation génique est une question importante dans le contexte de développement des organismes ciliés.

4. Les ciliopathies

Le cil primaire étant omniprésent et exerçant des fonctions cellulaires diverses et spécifiques durant le développement et l'homéostasie du tissu, il n'est pas surprenant de voir apparaître un nombre de plus en plus important de pathologies très invalidantes liées à une atteinte du cil et/ou du corps basal, regroupées sous le terme de ciliopathies.

La dyskinésie ciliaire primitive (ou syndrome de Kartagener) est la première ciliopathie mise en évidence en 1976 (Afzelius 1976). Elle est causée par des défauts de motilité des cils motiles et associe infertilité, bronchite chronique et défaut de la latéralité droite/gauche (*situs inversus*).

C'est en 2000 que G.J Pazour démontre que la formation de kystes rénaux (polykystose rénale) est associée à une absence de cil primaire. Cette découverte fait suite à l'étude de la souris mutante *orpk* (Oak Ridge Polycystic Kidney) dans laquelle le gène codant la protéine Ift88 (aussi appelée *tg737*) est muté, entraînant un désassemblage du cil (Gregory J Pazour et al. 2000). Depuis, d'autres ciliopathies causées par des mutations de gènes codant des protéines impliquées dans la fonction ou la structure du cil et/ou du corps basal ont été mises en évidence (Novarino et al. 2011; Fliegauf et al. 2007; Nigg & Raff 2009; Goetz & Anderson 2010). Le rôle joué par le complexe corps basal/cil dans l'homéostasie des tissus et dans les processus développementaux explique la multitude d'organes touchés par les ciliopathies : le rein, le foie, les os, la rétine, le cerveau, le pancréas etc. Les signes cliniques les plus fréquents sont les polykystoses rénales et hépatiques, un nombre anormal de doigts (polydactylie), une malformation du squelette (dysplasie osseuse), une dégénérescence de la rétine, un retard mental (Figure 6) (Goetz & Anderson 2010).

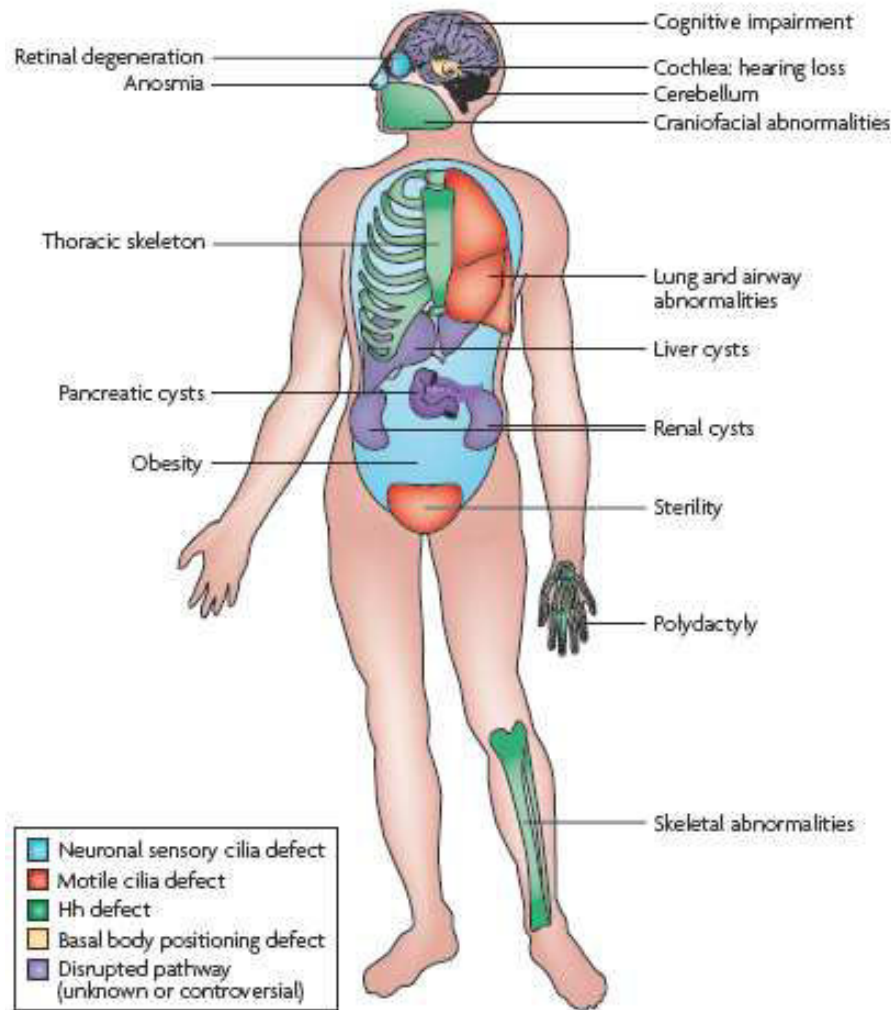


Figure 6 : Les ciliopathies : maladies pléiotropiques

Schéma représentant la diversité des organes atteints par un dysfonctionnement du cil primaire ou motile.

La dérégulation de la voie Hh induite par un dysfonctionnement du cil primaire entraîne en général des défauts squelettiques comme la polydactylie chez les patients de Bardet-Biedl et syndrome de Meckel, une dystrophie des côtes associées à une étroitesse thoracique dans le syndrome de Jeune ou encore un défaut des structure cranio faciales (encéphalocèle) dans le syndrome de Meckel.

Figure extraite de Goetz & Anderson (2010).

A ce jour, plusieurs dizaines de ciliopathies provoquées par un défaut de cil primaire ont été décrites (les plus connues sont la polykystose rénale, le syndrome de Joubert, de Meckel ou encore de Bardet-Biedl). Elles se caractérisent par un spectre clinique très complexe et d'importants chevauchements phénotypiques (Figure 7) (Gerdes et al. 2009; Novarino et al. 2011).

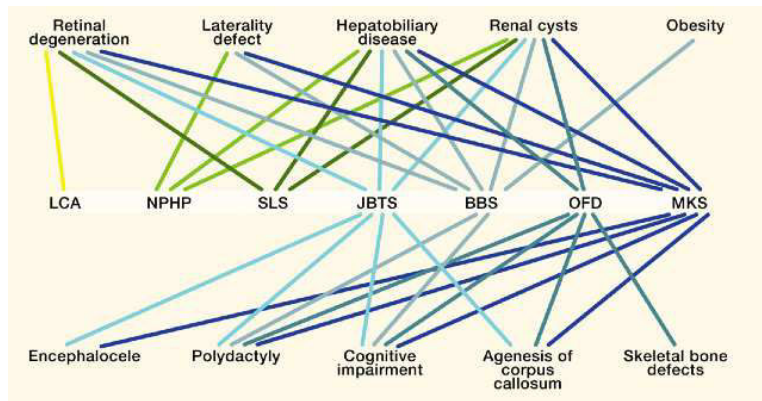


Figure 7 : Exemple de chevauchements phénotypiques entre différentes ciliopathies

BBS : Bardet-Biedl syndrome; JBTS : Joubert syndrome; LCA : Leber congenital amaurosis; MKS : Meckel syndrome; NPHP : nephronophthisis; OFD : Orofaciodigital syndrome; SLS : Senior Loken syndrome. Figure extraite de Novarino et al. (2011).

Des mutations d'un gène peuvent être responsables de différents types de ciliopathies. À l'inverse, une ciliopathie résulte très souvent de mutations dans différents gènes.

La survenue de ciliopathie peut s'expliquer par la mutation d'un groupe de gènes intervenant dans la structure ou la fonction du cil. Elles peuvent aussi être la conséquence d'un défaut dans la progression de la ciliogénèse (décrite dans le chapitre 2). La ciliogénèse requiert une succession d'événements coordonnés dans le temps et dans l'espace que sont la maturation du centriole père en corps basal (comprenant les étapes de migration du corps basal à la membrane apicale, l'ancrage du corps basal), l'élongation du cil. Une fois formé, le cil doit être convenablement orienté et contenir les composants ciliaires adaptés. Un défaut dans chacune de ces étapes aura pour conséquence une perturbation de différents aspects de la fonction ciliaire et donc l'apparition d'un type de ciliopathie (Figure 8).

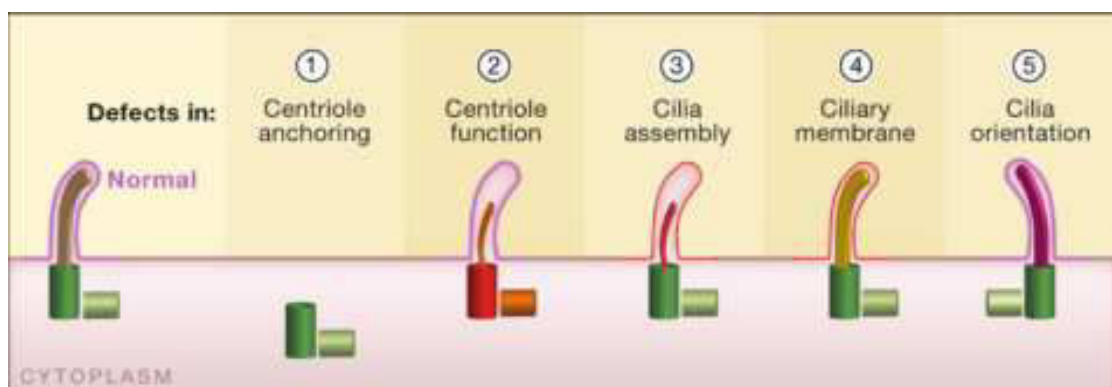


Figure 8 : Schéma illustrant les conséquences de différents défauts lors de la ciliogénèse sur l'apparition de ciliopathies.

Cas1 : les centrioles sont intègres mais ne peuvent pas migrer à la surface apicale. Cela semble être une des conséquences de la perte de deux protéines, meckeline et MKS1 associées au syndrome de Meckel-Grubert. Cas2 : les centrioles présentent un défaut de structure et sont donc dans l'incapacité d'initier l'assemblage d'un cil intègre. Cela semble être le cas lors de mutation de la protéine péricentrine associée au syndrome Seckel notamment. Cas3 : l'assemblage du cil est perturbé lorsque par exemple le système IFT est défectif ou lorsque l'assemblage de la membrane ciliaire est inhibée. Cas4 : défaut de localisation ou de fonction de protéines de la membrane ciliaire. Cela est caractéristique des maladies polykystiques rénales. Cas5 : mauvaise orientation du cil qui pourra avoir des conséquences sur le battement des cils motiles mais aussi sur la génération du flux nodal lors de l'embryogénèse. Figure extraite de Nigg & Raff (2009).

5. Acteur dans l'équilibre prolifération-différenciation

La formation du cil primaire et la progression du cycle cellulaire sont étroitement liées. En effet, le cil primaire est une structure post mitotique qui se forme uniquement lorsque les cellules sortent du cycle cellulaire et entrent en G0/G1. Cependant, sa présence à la surface membranaire n'est pas définitive car le cil est désassemblé avant l'entrée des cellules en mitose (sauf quelques exceptions). En effet, pour des raisons de fonction, le corps basal (ou centrosome) requis pour ancrer et former le cil en interphase doit pouvoir se libérer et se détacher du cil afin d'organiser le fuseau mitotique (Pan & Snell 2007).

La question posée ici est : comment est régulée la résorption du cil ou son maintien ? Nous verrons dans la partie suivante non seulement les protéines du cycle orchestrent la ciliation ou la déciliation, mais aussi certaines protéines ciliaires peuvent également influencer la progression du cycle cellulaire.

A. Coordination de la ciliogénèse et de la duplication du centrosome avec le cycle cellulaire

La duplication des centrioles et la division cellulaire sont deux étapes synchronisées. Durant la ciliogénèse, le centriole père s'ancore au cortex cellulaire et sert de base à nucléation des microtubules pour la formation du cil. En revanche, le centriole fils, encore immature et incomplet ne forme pas de cil mais reste associé au centriole père depuis la précédente division. Durant la réplication de l'ADN lors de la transition G1/S, chacun des centrioles père et fils se duplique pour former un nouveau centriole fils. Avant la mitose, le cil est résorbé, il se désassemble permettant à chaque nouvelle paire formée de centrioles de se détacher du cortex pour devenir un centre organisateur de microtubules ou centrosome. Chaque centrosome se dirige ensuite vers les deux pôles du fuseau mitotiques où ils organisent et positionnent le fuseau dit « bipolaire ». Durant la mitose, les deux paires de centrioles sont séparées par le fuseau mitotique de telle façon que chaque cellule fille hérite d'une paire de centrioles constituant un centrosome. Suite à l'entrée des cellules en phase G0/G1, le cil pourra ensuite être formé à nouveau dans chacune des deux cellules filles à partir de chaque centriole père (centriole mature) (Figure 9).

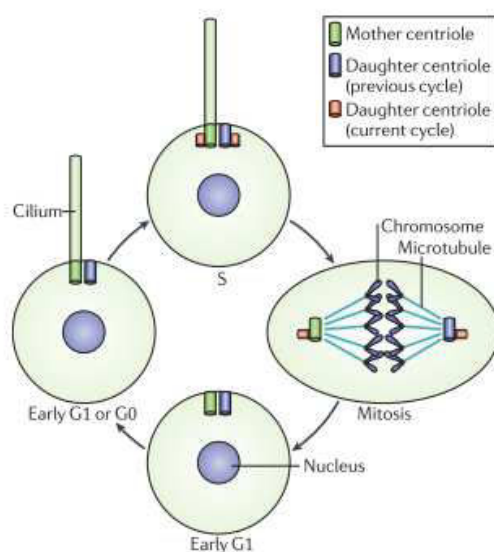


Figure 9 : Dynamique du centrosome et du cil primaire précisément synchronisée avec celle du cycle cellulaire. Figure extraite de Ishikawa & Marshall (2011).

Ainsi les processus d'élongation et de résorption du cil ainsi que la duplication des centrosomes et le cycle cellulaire doivent être hautement régulées et contrôlées. A l'instar des chromosomes, les centrosomes doivent se dupliquer une fois et une seule fois par cycle cellulaire. Un défaut dans ce processus peut causer de graves conséquences pour la cellule, telle que la formation de fuseaux mitotiques multipolaires, et une ségrégation anormale des chromosomes (Scheer 2014). Une amplification du nombre de centrosomes (mais ne formant au final que deux pôles mitotiques) pourrait expliquer l'aneuploïdie dans les cas de cancers. Dans certaines ciliopathies comme les polykystoses, ou syndrome de Meckel, il est observé un nombre anormal de centrosomes (ou « extra-centrosomes ») et entraînant l'apparition de multiples cils à la surface d'une seule cellule rénale (ou « extra-cils »). La présence de ces extra-cils réduit la concentration des molécules de signalisation au niveau de la membrane ciliaire en les répartissant dans chacun des cils présents affectant ainsi la capacité du cil à répondre aux signaux extérieurs (Figure 10) (Mahjoub & Stearns 2012).

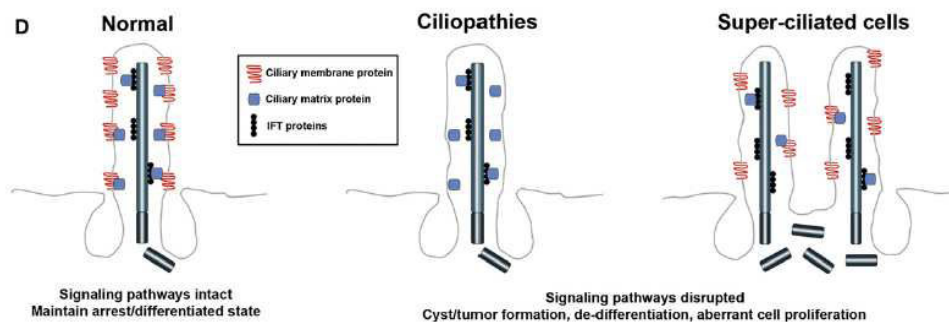


Figure 10 : Schéma illustrant le dysfonctionnement du cil engendré soit par une mutation d'un gène codant une protéine impliquée dans la structure ou la fonction du cil (ciliopathie) soit par la présence de cils surnuméraires diluant les composants responsables de la signalisation ciliaire. Figure extraite de Mahjoub & Stearns (2012).

B. Régulation réciproque entre ciliogénèse et cycle cellulaire

Une relation évidente existe entre la ciliogénèse et cycle cellulaire. Cependant, on peut se demander qui contrôle qui. Est-ce la machinerie du cycle cellulaire qui déclenche la formation/résorption du cil ? Au contraire, est-ce le cil qui envoie des signaux pour réguler la progression cellulaire ? Nous verrons à travers quelques exemples ci-dessous qu'il existe une réelle réciprocité régulatrice entre ces deux processus.

a. Des protéines du cycle cellulaire contrôlent la ciliogénèse

Il est désormais établi que le désassemblage du cil est déclenché par plusieurs protéines du cycle telles que la kinase AuroraA, une ubiquitine ligase APC (anaphase promoting complex) et une protéine de la famille NIMA (Never-In-Mitosis A) nommée Nek2.

De façon intéressante, deux d'entre elles - AuroraA et APC - contribuent à la stabilité des microtubules de l'axonème (acétylation et ubiquitylation respectivement). En effet, la tubuline de l'axonème est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylation,

polyglutamylation, détyrosination, polyubiquitylation, glycylation etc.), ce qui détermine la stabilité et les propriétés biochimiques de ce dernier. A ce titre, un changement de stabilité des microtubules ciliaires peut, dans une grande majorité des cas, engendrer une résorption complète du cil (Pedersen & Rosenbaum 2008). Les travaux de Pugacheva ont rapporté que la kinase centrosomale **AuroraA** dont l'activité est de réguler l'entrée en mitose à travers l'activation de la kinase cycline B1-Cdk1 et **HEF1** (Enhancer of Filamentation 1), une protéine des adhésions focales, sont nécessaires au désassemblage du cil (Pugacheva et al. 2007). Dès l'induction de la résorption du cil par des facteurs de croissance dans les cellules quiescentes, HEF1 phosphoryle et active AuroraA au corps basal. A son tour, AuroraA activée, phosphoryle et active l'histone déacétylase HDAC6. A son tour, HDAC6 déacétyle les microtubules de l'axonème, provoquant une résorption instantanée de l'axonème (Figure 11).

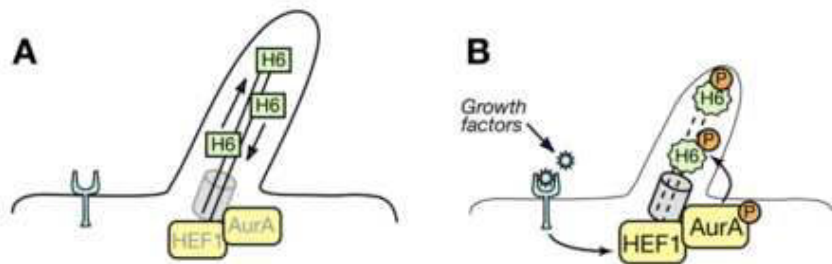


Figure 11 : contrôle de la ciliogénèse par des protéines du cycle cellulaire

A/ localisation de HEF1 et AuroraA au niveau des corps basaux des cellules ciliées

B/ la présence des facteurs de croissance active HEF1 qui phosphoryle et active AuroraA qui à son tour phosphoryle HDAC6, une histone déacétylase causant la résorption du cil.

Figure extraite de Pugacheva et al. (2007).

Outre la déacétylation provoquée par HDAC6 suite à l'activation de AuroraA, l'ubiquitylation constitue une autre modification post-traductionnelle recensée pendant la résorption du cil. L'ubiquitylation est un processus impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Une augmentation du niveau de protéines sujettes à l'ubiquitylation dans le flagelle de *Chlamydomonas* serait corrélée à la résorption de ce dernier (Huang et al. 2009). Depuis, d'autres études ont révélé la co-localisation au corps basal de cellules épithéliales humaines, de APC et de son co-activateur cdc20. Ces deux protéines ont deux fonctions principales: elles maintiennent la longueur optimale du cil dans les cellules quiescentes et sont requises pour la résorption du cil après la stimulation en sérum (Wang et al. 2014).

Trois kinases Neks, initialement impliquées dans l'entrée mitotique ont été observées au corps basal : Nek1, Nek2 et Nek8 et contribuent de façon différente au processus ciliogénique (Fry et al. 2012). **Nek2** a été très récemment identifiée pour sa fonction dans le désassemblage du cil. Elle cible Kif24, une kinésine, colocalisant avec une protéine centrosomale CP110 (Wang et al. 2014; White & Quarmby 2008). L'inhibition de Kif24 active la ciliogénèse anormale dans les cellules cyclantes alors qu'à l'inverse, sa surexpression bloque la formation du cil dans les cellules quiescentes et résulte en une réorganisation spécifique des microtubules émanant du centriole père (ou corps basal). Par ailleurs, Kif24 est capable de stabiliser et de maintenir la protéine CP110 aux centrioles (S. Kim, Lee, Choi, Ringstad, & Dynlacht, 2015; J. Li et al., 2013).

CP110, et sa partenaire Cep97, deux protéines centrosomales ont été identifiées comme inhibitrices des premières phases de la ciliogénèse au moment de la transformation du centriole

père en corps basal (Spektor et al. 2007). CP110 forme physiquement une coiffe aux bouts distaux des deux centrioles. De fait, CP110 agit structurellement en bloquant la croissance des microtubules émanant des deux centrioles et donc empêche l'initiation de la ciliogénèse afin d'éviter qu'elle ait lieu à n'importe quel moment du cycle cellulaire (Kleylein-Sohn et al. 2007). Ainsi, l'inhibition de CP110 ou de Cep97 engendre la formation d'un semblant de cil (ou d'un allongement du centriole père) dans les cellules en phase de prolifération. Réciproquement, la surexpression inhibe la ciliogénèse dans les cellules en quiescence suggérant leur rôle suppresseur dans le programme ciliogénique. En revanche, lorsque les cellules entrent en quiescence et débutent leur programme ciliogénique, CP110 et Cep97 sont extraites du centriole père permettant la transition du centriole père en corps basal. La localisation de CP110 au centrosome est régulée avec le cycle tout comme son niveau protéique. En effet, ce dernier chute durant les phases G2/M et G0/G1, conséquence d'un contrôle transcriptionnel, d'une ubiquitylation suivie d'une dégradation de CP110, d'un ciblage des ARNm par le **miR-129-3p** et d'une phosphorylation par **CDK2** (cyclin-dépendant kinase 2) (Tsang & Dynlacht 2013). Tous ces mécanismes ont pour but d'inhiber la fonction répressive de CP110 permettant ainsi l'engagement des cellules dans la ciliogénèse.

D'autres mécanismes contrôlant l'inhibition de CP110 impliquant les protéines Cep83, ttbK2 (Tau tubulin kinase 2), Cep104, MARK4 (microtubule associated protein affinity regulating kinase 4) existent, mais ne sont pas inhérents au cycle cellulaire ; ils seront donc abordés dans le chapitre II.

L'ensemble de ces exemples illustre la complexité de la régulation de l'assemblage/désassemblage du cil. Un jeu de régulations aussi bien positive que négative se met en place permettant une connexion entre le cil et la progression cellulaire. Ainsi, comme nous venons de le voir, des protéines associées au cycle peuvent influencer la capacité des cellules à pousser des cils ou à les résorber selon le contexte. A l'inverse, des protéines ciliaires peuvent directement perturber la durée du cycle cellulaire, la fidélité de la duplication des centrosomes ou encore la cytokinèse, indépendamment de leur rôle dans la structure ou la fonction ciliaire.

b. Des protéines du cil ou du corps basal régulent la prolifération

Des protéines ciliaires comme les **polycystines 1 et 2** (PC1 et PC2) contribuent à la régulation du cycle cellulaire. Il a été montré que la surexpression de PC1 dans les cellules rénales ralentit la prolifération et protège les cellules de l'apoptose via l'activation de p21 et un arrêt de cycle en G0/G1. D'autre part, PC1 et PC2 agiraient sur le cycle cellulaire en empêchant la translocation dans le noyau du facteur de transcription Id2, dont le rôle est de promouvoir la croissance cellulaire au détriment de la différenciation. Au final, PC1 et PC2 agissent en tant que suppresseur de tumeur puisqu'ils activent l'expression de p21 et de fait, ralentissent la prolifération (Irigoín & Badano 2011).

BBS4 et **BBS6** sont deux protéines appartenant au BBSome : BBS4, dont l'inhibition bloque la division cellulaire, l'ancrage des microtubules au centrosome et augmente le processus apoptotique et BBS6 dont la déplétion chez la souris entraîne un défaut de cytokinèse (Basten & Giles 2013). D'autres protéines du système IFT, telles **Ift27** et **Ift88** sont aussi actrices dans le contrôle du cycle. Ift27, en plus de son rôle dans le maintien de la stabilité des complexes IFT, représente un élément important dans le contrôle de la cytokinèse et de la progression cellulaire. Ift88 participe à la restriction de la transition G1/S. Dans les cellules HeLa non ciliées,

la surexpression de IFT88 active le suppresseur de tumeur Rb, et induit par conséquent l'arrêt des cellules en G1. L'inhibition de IFT88 quand à elle, favorise la progression du cycle (Robert et al. 2007).

Par ailleurs, il est intuitif et démontré que la longueur du cil a une conséquence directe sur la durée du cycle. La réduction de la taille du cil, voire même la perte totale du cil favorise l'entrée des cellules en phase S plus rapidement (Basten & Giles 2013). Au contraire, les cellules présentant un cil plus long, tardent à ré-entrer dans le cycle (Figure 12). Les travaux concernant la protéine centrosomale **Nde1** (nuclear distribution gene E homologue 1) vérifie cette corrélation (S. Kim et al. 2011). Son niveau protéique est élevé lors de la mitose et très bas en G0/G1, témoignant d'une corrélation inverse avec l'existence du cil. Sa déplétion entraîne la formation d'un cil anormalement long en plus d'un délai dans la transition G1/S, ce dernier étant proportionnel avec la longueur du cil. De façon intéressante, ce retard de cycle dans les cellules inhibées par Nde1 exhibant un cil très long, est restauré en inhibant de façon simultanée IFT88 ou IFT20. Par ailleurs, un allongement du cil provoqué par le traitement des cellules avec la cytochalasine D (agent dépolymérisant les filaments d'actine) retarde la transition G1/S. Ces résultats supportent l'hypothèse que la présence d'un cil influence négativement la progression du cycle. L'activité de Nde1, en agissant négativement sur la longueur du cil, doit être régulée en phase G1/G0 pour que la ciliogénèse puisse avoir lieu.

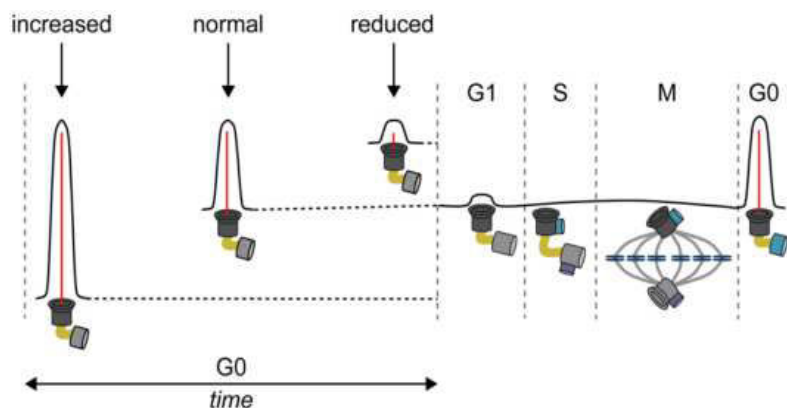


Figure 12 : La longueur du cil influe sur la progression du cycle cellulaire. Figure extraite de Basten & Giles (2013).

C. Déséquilibre de la balance prolifération/différenciation

a. Cas de la polykystose rénale

Le cil primaire a la capacité d'influer sur le cycle cellulaire et de réguler des cascades de signalisation. De plus, le cycle cellulaire coordonne la biogénèse du cil. C'est pourquoi, la perturbation de l'un de ces deux mécanismes peut causer une prolifération exacerbée. Le cil agit en règle général comme un tumeur suppresseur régulant l'équilibre prolifération/différenciation et favorisant la différenciation au détriment de la prolifération.

Un des meilleurs exemples illustrant un défaut dans la balance prolifération/différenciation concerne le développement de kystes, un phénotype très fréquent dans beaucoup de ciliopathies. Associé à des processus dysplasiques et des désordres prolifératifs, ce phénotype résulte, entre autre, d'un défaut de connexion entre le cil et le cycle cellulaire. En particulier, la polykystose rénale se caractérise par une dilatation des tubules rénaux et l'apparition progressive de kystes. Cette pathologie est très complexe étant donné les

nombreux processus pouvant être responsables de la formation de kystes (défaut de mécanosensation du cil rénal, de prolifération, de polarité ou encore un dérèglement des voies du développement) et la variété de fonctions extra-ciliaires jouées par les protéines du compartiment ciliaire (Figure 13) (Winyard & Jenkins 2011).

Des mutations dans des gènes codants pour les polycystines 1 et 2 sont les principales causes des polykystoses rénaux. L'absence ou le dysfonctionnement du cil aboutit alors à un défaut de mécanosensation, une interruption de la signalisation calcique et par conséquent à un excès de prolifération (Winyard & Jenkins 2011). Une anomalie lors de l'orientation du fuseau mitotique au cours de l'élongation des tubules rénaux peut aussi être mise en cause dans la formation des kystes. Dans les cellules saines, les cellules orientent leur fuseau mitotique de telle façon qu'il soit parallèle à l'axe du tube ce qui permet l'allongement du tube sans impacter son diamètre. Ift88 et Ift20 ont été identifiées pour leur fonction extra-ciliaire dans l'orientation du fuseau lors de la mitose des cellules rénales (Jonassen et al. 2008; Delaval et al. 2011). Dans le cas d'Ift20, c'est le mauvais positionnement des centrosomes qui est à l'origine d'une orientation aléatoire des fuseaux mitotiques et donc d'une dilation des tubules rénaux et de la formation rapide de kystes. Par ailleurs, d'autres études révèlent que les grandes voies de signalisation pilotées par le cil telles que les voies Wnt (en particulier la voie Wnt/PCP) et Hh sont dérégulées pouvant être un signal important pour la formation de kystes (Winyard & Jenkins 2011).

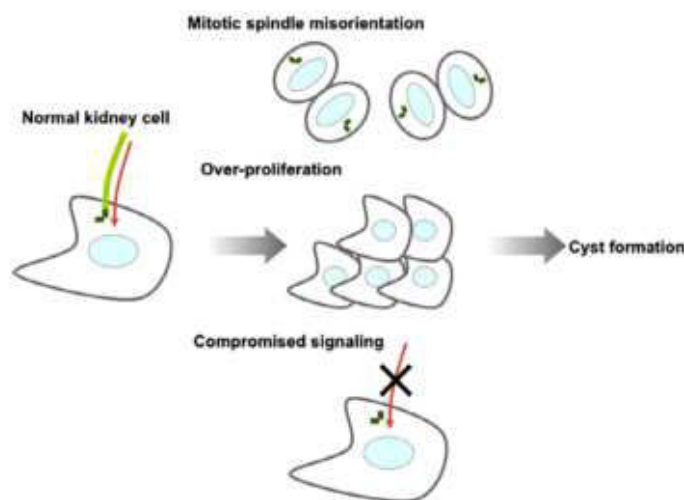


Figure 13 : Schéma représentant la relation causale entre perte/dysfonctionnement du cil primaire et la formation de kystes rénaux. Figure extraite de Kobayashi & Dynlacht (2011).

b. Cil et cancer

En raison de l'influence du cil primaire sur le cycle cellulaire, sur le pilotage des cascades de signalisation et de son incompatibilité avec la prolifération, il est tentant de penser que la perte du cil est une étape clé dans la formation de cancers. Cette assomption est souvent vraie car un grand nombre de cancers ont été attribués à une perte de cil tels que le cancer du sein (Menzl et al. 2014; S. Kim et al. 2015), les tumeurs métastatiques de mélanomes (J. Kim et al. 2011), prostatiques (Hassounah et al. 2013), le cancer ovarien (Egeberg et al. 2012), pancréatique (Cervantes et al. 2010), et le cancer colorectal (Rocha et al. 2014).

Une amplification de Aurora A de HEF1, ou encore de facteurs prométastatiques est associée au développement de certains cancers (cancer colorectal, cancer ovarien, et mélanomes notamment). Une dérégulation de la signalisation Aur1/HEF1/HDAC6 renforce le désassemblage du cil et inhibe les points de restriction dans la progression du cycle effectués par le corps basal. Ce dernier peut alors se différencier en centrosome qui sera ensuite

compétent pour coordonner l'entrée des cellules en phase S. La résorption du cil en perturbant la réponse des cellules aux signaux extérieurs induit une prolifération excessive.

Enfin, la sur-activation de la voie Hh est associée à de nombreux cancers humains comme des carcinomes basaux, des médulloblastomes, des glioblastomes, le cancer du pancréas, de l'ovaire, du sein, du rein et de la prostate. Cependant, la tumorigénèse n'est pas toujours associée à une perte du cil. Le cil peut être intact mais présenter un défaut dans la machinerie du système IFT qui est nécessaire pour accomplir les changements dynamiques de la localisation des composants modulant l'activité des voies de signalisation. Deux études récentes publiées simultanément ont montré le rôle pivot joué par le cil dans le développement de médulloblastomes et de carcinomes chez la souris (Figure 14).

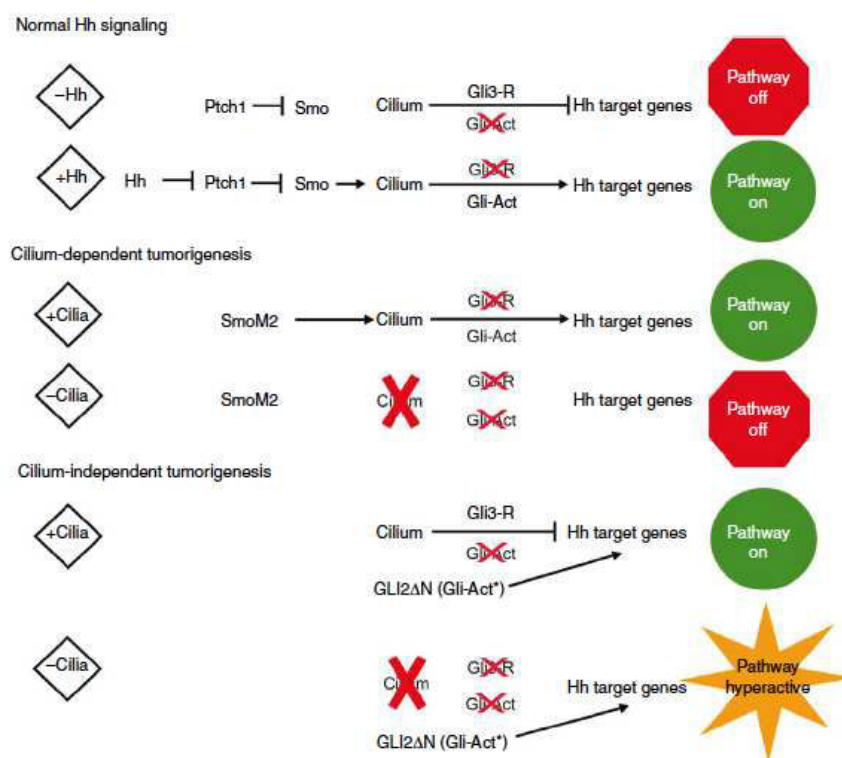


Figure 14 : Modèle résumant le rôle complexe du cil dans le développement du carcinome basal. Dans le cas normal, la présence du ligand Hh active la voie à travers la relocalisation de Patched1 et de smo et l'activation des Gli. La tumorigénèse est dépendante de la présence du cil lorsque smo est activée mais indépendante du cil lorsque Gli2 est le signal oncogénique. Figure extraite de Wong et al. (2009).

Le cil est capable à la fois d'activer et de réprimer la voie de signalisation Hh, selon si le signal oncogénique dépend de Smo ou de Gli2. Dans le cas de médulloblastomes, l'ablation du cil bloque le développement de ce type de tumeurs lorsque celle-ci est initiée par la protéine Smo, un activateur se trouvant en amont de la voie Hh. En revanche, la perte du cil peut aussi promouvoir et accélérer la croissance du médulloblastome lorsque le signal oncogénique est induit par Gli2, un facteur se trouvant en aval de la voie (Han et al. 2009). Wong et al montrent qu'ils obtiennent les mêmes conclusions dans un autre type de cancer qui est l'adénocarcinome (Wong

et al. 2009). L'ensemble de ces travaux révèle que la présence ou l'absence d'un cil intact peut avoir des conséquences radicalement différentes selon si le signal se trouve en amont (cas de Smo) ou en aval du cil (cas de Gli2).

Les exemples abordés dans cette partie, illustrant la relation entre le cil et le processus de cancérogénèse montrent à quel point ces mécanismes sont complexes et encore énigmatiques.

II. La ciliogénèse : succession d'évènements coordonnés menant à la formation du cil primaire

Dans les années 60, Sergei Sorokin découvre grâce à des observations en microscopie électronique que la formation du cil primaire est l'aboutissement d'une succession d'étapes cytoplasmiques coordonnées dans le temps et dans l'espace (Sorokin 1962). Elle débute lorsque les cellules entrent en quiescence. Elle comprend plusieurs étapes clés, communes à tous les modèles cellulaires : maturation du centriole père en corps basal comprenant la différenciation des deux appendices, la migration et l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique et la dernière phase consistant en la croissance du cil primaire. Cependant selon les types cellulaires, il observe des variations dans le déroulement de ces étapes et détermine l'existence de deux voies bien distinctes: la voie extracellulaire et la voie intracellulaire (Figure 15. Les cellules épithéliales polarisées adopteraient la voie extracellulaire. Dans ce cas, le corps basal migre et vient s'ancrer directement au cortex apical grâce aux fibres de transition permettant la nucléation des microtubules formant l'axonème en contact direct avec l'environnement extérieur. La voie intracellulaire concerne les fibroblastes, les myocytes, les neurones, et implique une étape supplémentaire cytoplasmique avant l'externalisation du cil. En effet, une fois différencié, le corps basal s'associe tout d'abord avec une vésicule ciliaire supposée provenir de l'appareil de Golgi. S'en suit un allongement d'une partie de l'axonème au sein de cette vésicule permise grâce à l'arrimage d'autres vésicules. Enfin, le cil encore naissant est externalisé suite à la fusion de la vésicule ciliaire avec la membrane plasmique. La machinerie IFT se met en place pour achever l'élongation du cil primaire (Benmerah 2012).

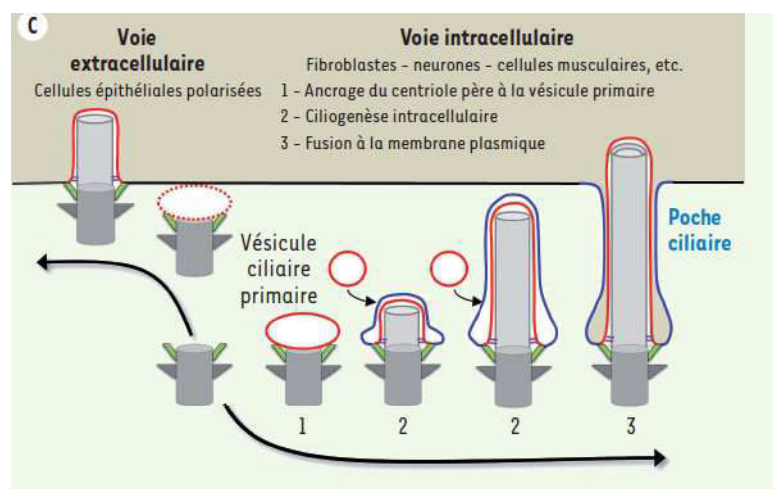


Figure 15 : Schéma illustrant les deux voies principales composées d'étapes cytoplasmiques menant à la formation du cil primaire. Figure extraite de Benmerah (2014).

Dans ce chapitre, je m'intéresserai plus spécifiquement à la voie intracellulaire car elle s'applique au modèle cellulaire avec lequel nous avons travaillé et qui est couramment utilisé pour étudier la ciliogénèse : les cellules immortalisées hTERT-RPE1 (human retinal pigmented epithelial cells).

A l'instar des processus orchestrant l'assemblage du cil, toutes les étapes en aval de celle-ci sont également extrêmement contrôlées et exigent un déroulement précis ainsi que des interactions moléculaires régulées dans le temps et dans l'espace afin d'assurer la fidélité de la ciliogénèse. Un dérèglement de l'une des ces étapes aboutit à un défaut de structure et/ou de

fonction du cil primaire et dans la majorité des cas à la survenue de ciliopathies (voir chapitre 1 ciliopathies). Afin de décrire les différentes étapes intracellulaires de la ciliogénèse, j'ai choisi de les présenter dans une première partie par ordre chronologique même si en réalité la ciliogénèse n'est pas une suite d'événements linéaires. Certaines étapes sont interdépendantes et il reste encore des zones d'ombre quand à l'ordre d'intervention de certaines étapes. La deuxième partie concernera le trafic, un processus omniprésent durant la ciliogénèse.

1. Différenciation du centriole père en corps basal

Une des premières étapes de la maturation du centriole père en corps basal concerne le recrutement spécifique de protéines aux appendices distaux et subdistaux du centriole père afin de le rendre ainsi compétent à l'association avec une vésicule ciliaire. Durant cette période, les appendices subdistaux se transforment alors en structures dites pieds basaux et les appendices distaux en fibres de transition.

En se projetant radialement à l'extrémité distale du corps basal, les fibres de transition forment une structure ressemblant à une roue à aube. Elles marquent physiquement le début de la zone de transition, laquelle est composée de doublets de microtubules. Le mode d'assemblage des appendices distaux/fibres de transition, leur composition moléculaire ainsi que leur mécanisme d'action restent encore élusifs et demeurent un domaine d'intenses investigations.

A. Formation des appendices distaux / fibres de transition

a. Assemblage

Les centrioles pères sont les seuls à pouvoir acquérir les appendices distaux et subdistaux. Cela prend un cycle cellulaire et demi pour que ces derniers soient matures et complets. Il est convenu dans la littérature que les appendices distaux se différencient en fibres de transition au moment de la maturation du centriole père en corps basal, c'est à dire lorsque ce dernier est capable de s'attacher à une vésicule ciliaire. A ce jour, la composition moléculaire spécifique de chaque structure expliquant la différence de nomenclature reste encore énigmatique. Le terme fibre de transition est souvent utilisé pour évoquer l'engagement des cellules dans un processus ciliogénique.

Quatre protéines ont été identifiées pour leur implication dans la formation des appendices distaux: **OFD1** (oral-facial-digital syndrome 1), **C2CD3** (C2 calcium-dependent domain containing 3), **Odf2** (outer dense fiber 2 ou cenexin) et **DZIP1** (DAZ-interacting zinc finger protein 1) (Singla et al. 2010; Ye et al. 2014; Ishikawa et al. 2005; Wei et al. 2015; Tateishi et al. 2013).

OFD1 et C2CD3 contrôlent spécifiquement l'assemblage des appendices distaux et sont impliquées dans le contrôle de la longueur des centrioles. L'absence de OFD1 de l'extrémité distale des centrioles des cellules souches embryonnaires murines résulte en un allongement anormal de cette structure, associée à un défaut d'assemblage des appendices distaux et de la ciliogénèse, révélant sa fonction dans le maintien de la longueur des centrioles (Singla et al. 2010). C2CD3 est une protéine des satellites centriolaires et des appendices distaux. Elle promeut notamment l'assemblage des appendices distaux en recrutant les cinq protéines connues qui les composent (Ccdc41, Sclt1, Cep89, Fbf1 et Cep164). De plus, elle interagit physiquement avec OFD1. Son rôle, qui est de promouvoir l'élongation des centrioles, est

antagonisé par OFD1 dont la fonction est de bloquer l'allongement des centrioles (Thauvin-Robinet et al. 2014).

Les deux autres protéines Odf2 et DZIP1 sont nécessaires à la genèse des deux types d'appendices. Le rôle de ODF2 dans l'assemblage des appendices reste controversé suite à une étude montrant que l'inhibition de ODF2 n'a aucun effet sur le recrutement des protéines des appendices distaux.

Par ailleurs la déplétion d'une des protéines composant les appendices distaux n'affecte pas la localisation des protéines des appendices subdistaux révélant ici que l'assemblage de ces deux types de structures sont indépendantes l'un de l'autre (Tanos et al. 2013). Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle exact de chaque acteur dans le contrôle de l'assemblage des appendices distaux.

b. Composition moléculaire

La liste des protéines composant les appendices distaux n'est certainement pas exhaustive à ce jour et reste encore à compléter grâce à des études protéomiques notamment. **Cep164** a été la première protéine des appendices distaux à être identifiée et caractérisée. Les cellules déficientes en Cep164 ne développent pas de cil primaire (Graser et al. 2007; Schmidt et al. 2012; Cajánek & Nigg 2014; Slaats et al. 2014; Oda et al. 2014). Puis, à partir de 2013, des études de localisation subcellulaires en immunofluorescence et microscopie super résolution ont permis d'ajouter de nouveaux candidats à la liste comme la protéine **Cep89** (ou Ccdc123/CEP123) qui est aussi localisée aux satellites centriolaires (Sillibourne et al. 2013). Tanos et collaborateurs identifient d'autres protéines des appendices distaux comme **Cep83/CCDC41** (Coiled coil domain containing 41), **SCLT1** (Sodium channel and clathrin linker 1) et **FBF1** (Fas (TNFRSF6) binding factor 1). Ils montrent que la localisation aux appendices distaux de toutes ces protéines est réalisée de manière ordonnée et hiérarchique. Cep83 se situe en amont de la voie et orchestre le ciblage des quatre autres protéines. SCLT1 affecte spécifiquement la localisation de FBF1 et de Cep164 (Figure 16) (Tanos et al. 2013).

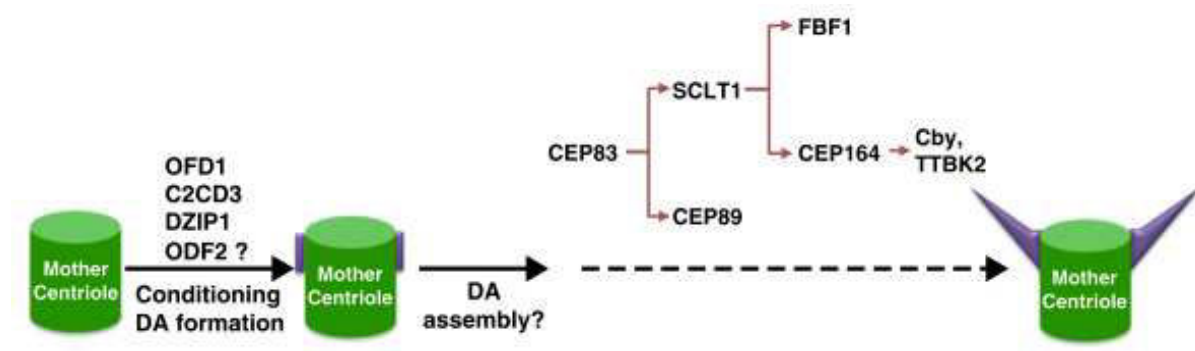


Figure 16 : Schéma illustrant les mécanismes menant à l'assemblage des appendices distaux/fibres de transition. Leur formation est sous le contrôle de OFD1, C2CD3, DZIP1 et probablement de ODF2. Puis différents composants structuraux et fonctionnels sont recrutés aux appendices de manière très organisée et hiérarchisée. Figure extraite de Wei et al. (2015).

c. Fonctions des appendices distaux/fibres de transition

Le rôle joué par les appendices distaux/fibres de transition est multiple et primordial pour la progression de la ciliogénèse. Le recrutement de *ttbk2* aux appendices distaux induisant le retrait consécutif de CP110 du centriole père, un signal clé pour l'engagement des cellules quiescentes dans le programme de ciliation. Le recrutement de *ttbk2* est assuré essentiellement par des protéines des appendices distaux telles que Cep83, Cep164, et C2CD3 (Cajánek & Nigg 2014; Ye et al. 2014; Tanos et al. 2013). A titre d'exemple, l'absence de Cep83 bloque le recrutement de *ttbk2* et la relâche de CP110 du centriole père, inhibant ainsi l'ancrage de ce dernier à la vésicule ciliaire (Tanos et al. 2013).

L'organisation des fibres de transition en forme d'anneau à l'extrémité distale du corps basal est essentielle au recrutement de la vésicule ciliaire au corps basal (Burke et al. 2014). Ce sont des protéines des fibres de transition qui confèrent au corps basal la propriété de pouvoir s'attacher fixement avec la vésicule ciliaire qui, une fois fixée, recouvrira l'extrémité distale du corps basal. Les protéines Cep164, Cep123, C2CD3, Cep83 (ou CCDC41), dont la déficience inhibe la formation du cil, sont impliquées dans l'étape d'association corps basal/vésicule ciliaire, étape essentielle pour le futur ancrage du corps basal à la membrane et la croissance du cil primaire (Tanos et al. 2013; Joo et al. 2013; Schmidt et al. 2012; Sillibourne et al. 2013). Le mode d'interaction des fibres de transition avec les membranes (de la vésicule ou de la membrane plasmique) reste encore à déterminer.

Enfin, les appendices distaux représentent une plate-forme pour le stockage et l'ancrage des particules IFT au centriole père, suggérant un autre mécanisme par lequel les appendices distaux sont impliqués activement dans la ciliogénèse (Tanos et al. 2013; Ye et al. 2014; Cajánek & Nigg 2014; Joo et al. 2013; Wei et al. 2013).

B. Formation des appendices subdistaux/pieds basaux

Le centriole père se distingue du centriole fils par l'acquisition d'appendices distaux mais aussi subdistaux. La matrice péri-centriolaire entoure la paire de centrioles et représente un site d'ancrage pour les complexes multiprotéiques de tubuline gamma pouvant exister sous la forme d'anneaux ouverts appelés « gamma-tubulin ring complexes » ou « gamma-TuRCs », impliqués dans la nucléation des microtubules au centrosome (Bornens 2002). Ces microtubules sont préférentiellement ancrés aux appendices subdistaux des centrioles pères, conférant au centrosome le rôle de centre organisateur de microtubules. En plus d'agir dans l'ancrage des microtubules, ces appendices sont requis lors de la ciliogénèse. Pendant la ciliogénèse, et plus spécifiquement lorsque le corps basal rencontre la vésicule ciliaire, les appendices subdistaux se différencient en pieds basaux, structures distinctes morphologiquement des appendices distaux, se projetant de façon orthogonale au corps basal.

a. Assemblage

Quatre protéines ont été identifiées pour contrôler la formation des appendices subdistaux : **Odf2** et **DZIP1** aussi impliqués dans la genèse des appendices distaux, **Cc2d2a** (coiled coil and C2 domain-containing 2A), et **Kif3A**, une sous unité de la protéine motrice kinésine 2 (Kodani et al. 2013; Veleri et al. 2014; Wei et al. 2015).

La mutation du gène CC2D2A est impliquée dans les syndromes de Meckel et de Joubert. La protéine est localisée au niveau des appendices subdistaux du centriole père. Elle est requise à la formation du cil primaire et posséderait un domaine de liaison aux microtubules. Les cellules MEFs (mouse embryonic fibroblasts) déficientes montrent un défaut de recrutement de Odf2 et de la ninéine (nécessaire à l'ancrage des microtubules) aux appendices subdistaux. Cela bloque ainsi l'assemblage des appendices subdistaux et l'ancrage des microtubules (Veleri et al. 2014).

Kif3A est impliquée dans le transport antérograde de cargos et de protéines ciliaires le long de l'axonème du cil primaire. Par conséquent, son inhibition provoque un défaut de ciliogénèse. Cela est dû non seulement à un défaut de la fonctionnalité du complexe IFT, mais aussi à un défaut d'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux. En effet, Kif3A est impliquée dans le recrutement au centriole père de p150^{Glued} qui est une sous-unité de la dynactine (protéine motrice des microtubules essentielle à l'activité de la dynéine). Le recrutement de p150^{Glued} contribue à l'organiser des appendices subdistaux. En collaboration avec p150^{Glued} et la ninéine, Kif3A est donc nécessaire à l'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux (Kodani et al. 2013).

b. Composition moléculaire

Peu d'études se concentrent sur la composition moléculaire et le rôle précis des appendices subdistaux/pieds basaux durant la ciliogénèse. Elle est encore plus parcellaire que celle des appendices distaux. A ce jour, quelques protéines y ont été observées: la **ninéine** requise dans l'ancrage des microtubules, **Odf2/cenexine**, **Kif24** (qui réorganise les microtubules et agit comme un inhibiteur de la ciliogénèse via CP110), **Cc2d2a**, récemment identifié comme acteur crucial dans la genèse des appendices subdistaux (Kobayashi et al. 2011; Garcia-Gonzalo et al. 2011; Bornens 2002; Veleri et al. 2014). De plus, **ε-tubuline**, **Cep170** et la **centrioline** complètent la liste et agissent dans l'organisation des microtubules bien que le rôle exact des deux dernières reste encore obscur (Azimzadeh & Bornens 2007).

c. Fonctions des appendices subdistaux

Si un des rôles des appendices distaux est de permettre l'ancrage de la vésicule ciliaire au corps basal et à la membrane plasmique, celui des appendices subdistaux consiste principalement à ancrer et stabiliser les microtubules cytoplasmiques au centriole père (Figure 17) (Tateishi et al. 2013). Cette particularité semble être cruciale dans les cellules multiciliées. Les pieds basaux ne semblent pas participer à l'association de la vésicule primaire au corps basal, mais à l'arrangement d'un réseau apical de microtubules très organisé et régulier et à l'établissement de la polarité planaire dans les cellules multiciliées. Par conséquent, les microtubules cytoplasmiques émanant des pieds basaux sont orientés dans la direction du fluide et alignent le battement ciliaire avec la direction de la force (Tsukita et al. 2012). Un défaut d'organisation des microtubules est responsable de dyskinésie ciliaire.

Par ailleurs, de façon surprenante, l'étude concernant Cc2d2a dans des MEFs révèle que les appendices subdistaux seraient impliqués dans la formation du cil et plus précisément dans l'ancrage de la vésicule et l'initiation de l'axonème. Outre son rôle dans la formation des appendices subdistaux, Cc2d2a pourrait être nécessaire à la formation de la zone de transition, d'une part via son interaction avec Cep290. D'autre part, elle permettrait l'accès des vésicules

pour l'assemblage de la vésicule ciliaire aux appendices distaux via Odf2. Ces multiples fonctions jouées par Cc2d2a expliquent les conséquences désastreuses de son absence dans des modèles murins. En effet, elle entraîne une létalité embryonnaire associée à des désordres atteignant de multiples organes (Veleri et al. 2014).

Aussi, les microtubules cytoplasmiques dont les bouts moins sont ancrés aux appendices subdistaux/pieds basaux forment de véritables rails favorisant le trafic polarisé de vésicules et de protéines jusqu'au corps basal, processus crucial pour la ciliogénèse (Veleri et al. 2014).

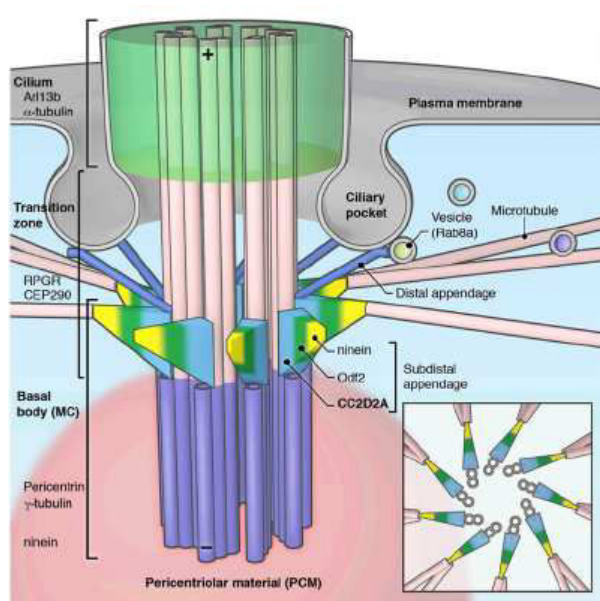


Figure 17 : Schéma illustrant le rôle des appendices subdistaux

Partie violette: le corps basal; Partie rose : la zone de transition

Les appendices subdistaux sont caractérisés par la présence successive de 3 protéines : CCDD2A, Odf2 et la ninéine.

Emanent à partir des appendices subdistaux, les microtubules sur lesquels transitent des vésicules Rab8a adressées à la zone de transition. CC2D2A et Odf2 pourraient favoriser ce trafic vésiculaire. Figure extraite de Veleri et al. (2014).

L'acquisition des appendices distaux et subdistaux est nécessaire au processus ciliogénique. Toutefois, le moment précis où le centriole fait l'acquisition de ces structures reste encore flou (Dawe, Farr, et al. 2007). En absence des appendices distaux, les centrioles seraient capables de migrer au cortex mais incapables de s'y ancrer (Tanos et al. 2013). Il est sûr cependant que la formation de ces structures est un prérequis pour l'association avec la vésicule ciliaire qui sera nécessaire à l'ancrage du corps basal au cortex (Ye et al. 2014).

C. Levée d'inhibition du programme ciliogénique : rôle de CP110

La transition du centriole père en corps basal consiste non seulement en la maturation des appendices mais aussi en le déblocage de l'inhibition de CP110. Les bases moléculaires gouvernant ce processus ne sont pas encore bien comprises. Cependant, il est bien établi que cette transition ne peut s'accomplir que si et seulement si, le complexe répresseur CP110-Cep97 est extrait physiquement du centriole père, permettant la nucléation des microtubules centriolaires (Spektor et al. 2007). CP110 et Cep97 n'agissent pas seules, d'autres protéines régulatrices comme Kif24, Cep104, Cep290 s'associent avec elles pour former un complexe. Ces dernières peuvent de part leur activité sur CP110, soit activer (Cep104), soit inhiber (Kif24, Cep97) la ciliogénèse. Ainsi, l'engagement des cellules dans le programme ciliogénique implique l'action de modulateurs qui agiront pour favoriser le retrait de CP110, d'une part en réprimant

les activateurs de CP110, et d'autre part en activant ou en recrutant des composants inhibant l'action répressive de CP110 et des ses protéines associées (Figure 18) (Kobayashi & Dynlacht 2011).

Kif24, fait partie du complexe et contribue à la suppression de la ciliation. C'est un moteur moléculaire appartenant à la famille des kinésines possédant une activité de dépolymérisation des microtubules. Il interagit spécifiquement avec CP110 et Cep97 et recrute CP110 au centriole père (Kobayashi et al. 2011).

Contrairement à CP110, Cep97 et Kif24, **Cep104** semble faire partie des régulateurs positifs de la ciliogénèse. L'absence de Cep104 réduit la capacité des cellules hTERT-RPE1 à développer un cil. C'est une protéine de liaison avec les bouts « + » des microtubules. Elle se trouve localisée à l'extrémité distale des deux centrioles des cellules en arrêt de cycle jusqu'à ce que le corps basal forme un cil. (Tsang & Dynlacht 2013). Elle participe également au recrutement de Cep97 aux centrioles. Les mécanismes de retrait de CP110 et de Cep97 sont encore énigmatiques mais Cep104 pourrait maintenir la présence de CP110 et de Cep97 au centriole père jusqu'aux phases précoces de la ciliogénèse. Lorsque la ciliogénèse est initiée, Cep104 se déplace jusqu'au sommet du cil, libérant ainsi CP110 et Cep97 du centriole père. (Tsang & Dynlacht 2013; Satish Tammanna et al. 2013).

Le rôle de Cep290 est double. La capacité de CP110 à bloquer le processus de ciliogénèse dépend de son interaction avec Cep290. Si l'interaction est inhibée, alors CP110 est dans l'incapacité de réprimer l'assemblage du cil dans les cellules quiescentes. D'autre part, Cep290 a la capacité de favoriser la fusion du centriole père avec la vésicule ciliaire via l'interaction avec Rab8. Cette fonction positive de Cep290 est antagonisée par CP110 (Tsang & Dynlacht 2013; Kobayashi et al. 2014).

Le mécanisme menant au retrait de CP110 restait encore énigmatique jusqu'à la découverte du rôle positif de deux kinases sérine/thréonine, dont l'action se porte sur les microtubules : **MARK4** et **ttbk2** (Rovina et al. 2014; Liao et al. 2015). Aucune de ces kinases n'a été montrée pour interagir directement avec ce complexe, suggérant un rôle probable de la phosphorylation dans le retrait de CP110 et Cep97. Associé au corps basal et à l'axonème, MARK4 participe au recrutement de Odf2 (acteur dans la genèse des appendices et dans l'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux) au centriole père. Son absence bloque la ciliogénèse dans les phases précoces, puisque CP110 et Cep97 sont encore présentes au corps basal.

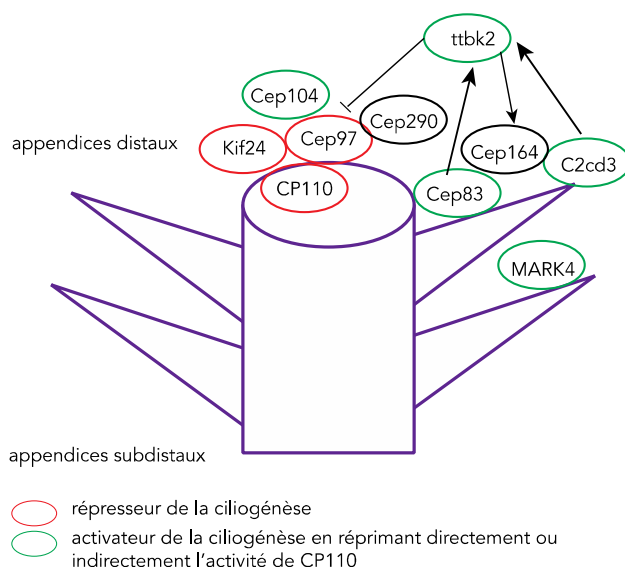


Figure 18 : Ensemble de protéines impliquées directement ou indirectement à la stabilisation ou à la répression (ou extraction) de CP110.

La présence de CP110 au centriole père est ainsi contrôlée par une cascade complexe d'activateurs et d'inhibiteurs dont il est intéressant de noter qu'ils partagent tous la propriété de liaison aux microtubules. Cela souligne l'importance de la régulation de la dynamique des microtubules lors de la ciliogénèse.

Le retrait de CP110 du centriole père est indispensable à la croissance de l'axonème au sein de la vésicule (Spektor et al. 2007). Le moment du retrait de CP110 reste encore inconnu. Une étude montre que l'ancrage du centriole à la membrane pourrait fournir un signal nécessaire au retrait de CP110 (Tanos et al. 2013). D'autres travaux révèlent que le réarrangement du cytosquelette d'actine au cortex, étape cruciale pour l'ancrage du corps basal, a lieu en aval du retrait de CP110 (Hong et al. 2015).

D. Association du corps basal avec la vésicule ciliaire

L'association de la vésicule ciliaire au corps basal constitue le premier événement de la ciliogénèse observable en microscopie lors de la voie intracellulaire décrite par S. Sorokin. Cette étape s'est avérée très récemment plus complexe que celle décrite. En effet, elle est précédée par l'amarrage à l'extrémité distale du corps basal d'un groupe de petites vésicules pré-ciliaires appelées vésicules des appendices distaux (ou DAV : distal appendages vesicles). La fusion ainsi que la formation de la vésicule ciliaire sont notamment régulées par la protéine de remodelage de membrane EHD1/3 (famille de protéines Eps15) et la protéine SNAP29 du complexe SNARE (Synaptosomal-associated protein 29). L'assemblage complet de cette vésicule dépendant de EHD1/3 est précédé par la perte de CP110 du centriole père et le recrutement de Ift20 (Figure 19). Ift20 joue ainsi un rôle prépondérant dans la formation de la vésicule ciliaire (Joo et al. 2013; Follit et al. 2006; Lu et al. 2015).

Les bases moléculaires orchestrant l'ancrage des petites vésicules aux appendices distaux restent encore fragmentaires.

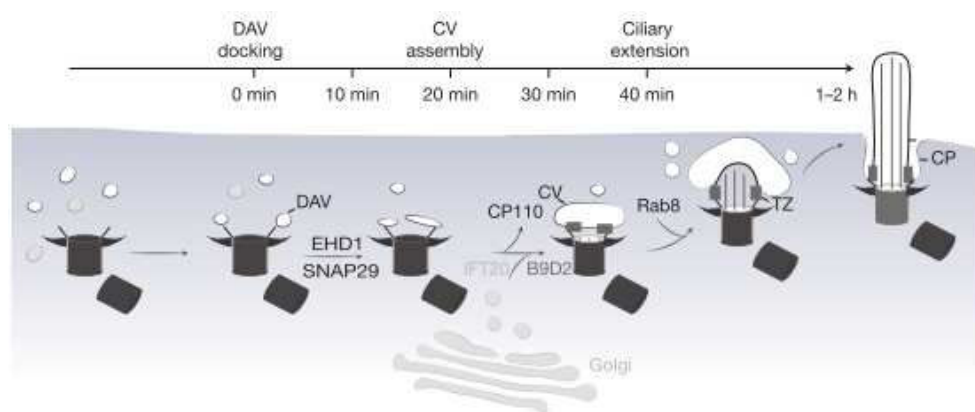


Figure 19 : Description des différentes étapes successives intracellulaires aboutissant à l'externalisation du cil dans les cellules RPE1. La ciliogénèse débute avec l'arrivée de petites vésicules pré-ciliaires ou DAV (distal appendage vesicle) à l'extrémité distale du centriole père. Figure extraite de Lu et al. (2015).

Il est établi que la vésicule ciliaire englobe l'extrémité distale du corps basal au centriole père et qu'une partie de l'axonème y grandit à l'intérieur. Cependant, outre son origine, sa fonction réelle reste encore mystérieuse. D'autant que la voie dite extracellulaire ne nécessite

apparemment pas de vésicule ciliaire... Pour quelles raisons la voie intracellulaire requiert-elle l'apport de la vésicule ciliaire ? Une question encore non élucidée...

E. Formation de la zone de transition et d'une partie de l'axonème au sein de la vésicule

L'ancrage de la vésicule ciliaire à l'extrémité distale du corps basal marque le début d'une phase de croissance intracellulaire du cil primaire, consistant en la nucléation de courts doublets de microtubules et en la formation de la zone de transition, mécanismes coordonnés avec le remodelage de la vésicule ciliaire.

La zone de transition se forme donc très précocement au cours de la ciliogénèse. A ce stade, elle renforce et stabilise certainement la connexion entre le corps basal et la vésicule ciliaire et contribue au processus de compartimentalisation du cil naissant. De plus, une fois sa maturation achevée, la zone de transition agit comme un filtre indispensable à la restriction des mouvements de composants pouvant entrer ou sortir du cil.

a. Assemblage de la zone de transition

L'enchaînement de ces événements est peu connu mais un modèle proposé par S. Sorokin suggère que l'interaction entre le corps basal et la vésicule ciliaire est établie par la formation du collier ciliaire (ou « necklace »), un site d'association fort entre la membrane et les doublets de microtubules nouvellement assemblés (Reiter et al. 2012).

Plusieurs études s'accordent sur le fait que des facteurs de la zone de transition appartenant à des modules définis (MKS/JTBS et NPHP) sont pré-assemblés à l'extrémité distale du corps basal au moment où la vésicule ciliaire est formée. Lu et collaborateurs démontrent que des composants de ces modules tels Cep290, MKS5/RPGRII, MKS3/TMEM67 (gène codant la protéine meckeline) sont recrutés au corps basal juste avant la formation complète de la vésicule ciliaire ancrée au corps basal. Dans les cellules déficientes en EHD1, la localisation de toutes ces protéines est bloquée et entraîne un défaut d'assemblage de la vésicule et de la croissance du cil. Cela révèle la nécessité de l'étape d'assemblage de la vésicule dépendante de EHD1 pour le recrutement de toutes ces protéines au corps basal (Lu et al. 2015).

Cep290 joue un rôle critique dans la formation de la zone de transition en initiant l'assemblage des liens membrane/microtubules dans le flagelle de *Chlamydomonas* et dans le recrutement d'autres protéines (Craig et al. 2010). Une autre étude révèle que Cep162 possède une activité de liaison aux microtubules et joue le rôle de promoteur dans la formation de la zone de transition. En effet, localisée à l'extrémité distale du corps basal au moment de la formation des microtubules ciliaires naissants, elle se lie avec Cep290 facilitant ainsi l'association de ce dernier avec les microtubules ciliaires et permettrait de fermer le compartiment ciliaire (Wang et al. 2013).

Les étapes concernant l'ancrage de la vésicule, la formation de cette portion d'axonème et la formation de la zone de transition seraient indépendantes du système IFT.

b. Extension de l'axonème couplée à celle de la vésicule ciliaire

Puis s'ajoutent et fusionnent à la vésicule ciliaire d'autres vésicules dites secondaires. Celle-ci apporteraient la membrane nécessaire pour permettre d'une part l'allongement de la

vésicule ciliaire synchronisée avec l'élongation de l'axonème, et d'autre part des composants ciliaires (processus détaillé dans la partie 2). La croissance des microtubules ciliaires entraîne une invagination de la paroi interne de la vésicule formant une double membrane enveloppant l'extrémité apicale du corps basal en cours de nucléation. La face interne deviendra la future membrane ciliaire. La base incurvée se formant à l'endroit où se contactent les fibres de transition et la vésicule deviendra la poche ciliaire (Figure 20). C'est à ce stade que la machinerie IFT et autres processus de transport délivrant du matériel au cil seraient responsables de la croissance du cil dans le cytoplasme.

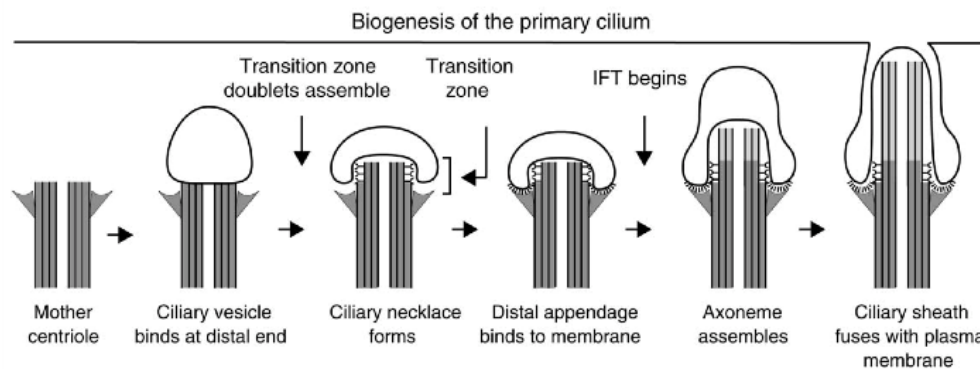


Figure 20: Modèle représentant la biogénèse du cil primaire. Figure extraite de Rohatgi & Snell (2010).

2. Trafic polarisé vers la base du cil

Le bon déroulement de toutes les étapes décrites précédemment ainsi que la fonction du cil nécessitent un trafic dynamique, continu jusqu'au corps basal. Ce trafic est requis pour l'apport de protéines nécessaires à la maturation des appendices, à l'amarrage des petites vésicules aux appendices distaux, au recrutement de composants qui seront ensuite intégrés à l'axonème tels les protéines IFT, les protéines de structure de l'axonème ainsi que des récepteurs, des protéines ciliaires pour assurer une signalisation effective. Un dysfonctionnement de ce trafic omniprésent résulte en la survenue de ciliopathies (Madhivanan & Aguilar 2014). Le trafic est par conséquent nécessaire à la formation, la fonctionnalité et la maintenance du cil. La destination des composants ciliaires à la base du cil est permise grâce à plusieurs modes de transport :

- des vésicules issues soit de l'appareil de Golgi, soit de la voie d'endocytose et véhiculant des protéines membranaires destinées au cil
- le complexe dynéine-dynactine le long des microtubules lesquels sont ancrés aux appendices subdistaux pour l'adressage de protéines solubles nécessaires à la formation du cil

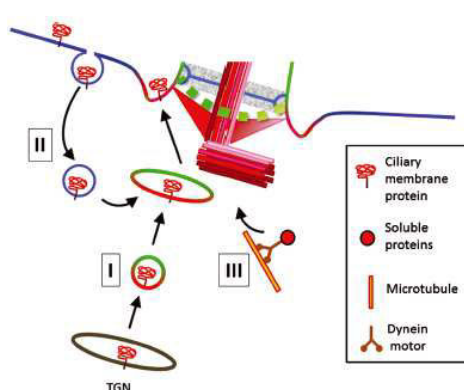


Figure 21: Différents modes de transport de composants à la base du cil primaire

I Les vésicules provenant de l'appareil de Golgi et véhiculant des protéines membranaires ciliaires
 II Voie endocytaire permettant aux protéines membranaires ciliaires d'incorporer des vésicules post-Golgi
 III Transport des protéines solubles grâce au complexe dynéine/dynactine Figure extraite de Madhivanan & Aguilar (2014).

A. Trafic vésiculaire polarisé de l'appareil de Golgi/endosomes de recyclage vers la base du cil

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expansion de la vésicule ciliaire est synchronisée avec l'élongation de l'axonème. La membrane nécessaire à l'allongement de la vésicule ciliaire est véhiculée par des vésicules supplémentaires qui viennent fusionner à la vésicule initiale. L'incapacité à former un cil des cellules traitées avec la Bréfeldine A, une drogue désorganisant la structure de l'appareil de Golgi, démontre que des vésicules proviennent principalement de ce compartiment (Madhivanan & Aguilar 2014).

Ces vésicules peuvent contenir deux protéines de la future membrane ciliaire : Rab8 et/ou Smo et aussi transporter des protéines IFT et des protéines ciliaires.

a. Les vésicules Rab8/Rab11

Westlake et collaborateurs détaillent dans les cellules hTERT-RPE1, le transport vésiculaire impliquant des GTPases de la famille Rabs dont Rab8 et Rab11. Rab8 est la seule Rab localisant au cil primaire. Elle est mise en jeu dans la sécrétion de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Rab11 constitue quant à elle un élément clé du recyclage des endosomes. L'expression d'un mutant dominant négatif de Rab8 inhibe la formation du cil, indiquant que l'activation de Rab8 est cruciale pour le processus ciliogénique. En réponse au retrait de sérum, les vésicules endosomales contenant Rab11 recrutent Rabin8 (un facteur d'échange GTP/GDP de Rab8) associé au complexe de trafic de vésicules TRAPPII (transport protein particle II) (Westlake et al. 2011). Rabin8 en retour, associé à l'action de nombreuses protéines telles que Cep164, Cep290, PCM1, Hook2, Talpid3 et CC2D2A (dans les photorécepteurs dans ce cas précis) ciblent le transport des vésicules à la base du cil. Une fois les vésicules arrimées, la liaison de Rabin8 à Rab11 stimule l'activité d'échange de Rabin8 en Rab8 (Figure 22) (Kobayashi et al. 2014; Schmidt et al. 2012). Enfin, Rab8 sous sa forme activée recruterait ensuite au corps basal des effecteurs pour l'assemblage et la fusion des vésicules à la membrane ciliaire. Ce processus facilite ainsi la biogénèse de la vésicule et de fait, la croissance du cil. L'allongement de la vésicule ciliaire serait la conséquence de l'association des protéines Cep164/Chibby et la machinerie de trafic Rab8/Rabin8 recrutant vraisemblablement plus de vésicules Rab8 positives aux fibres de transition (Burke et al. 2014). Une fois la croissance du cil achevée, Rabin8 n'est plus présent au corps basal et le trafic de Rab8 est largement réduit (Westlake et al. 2011).

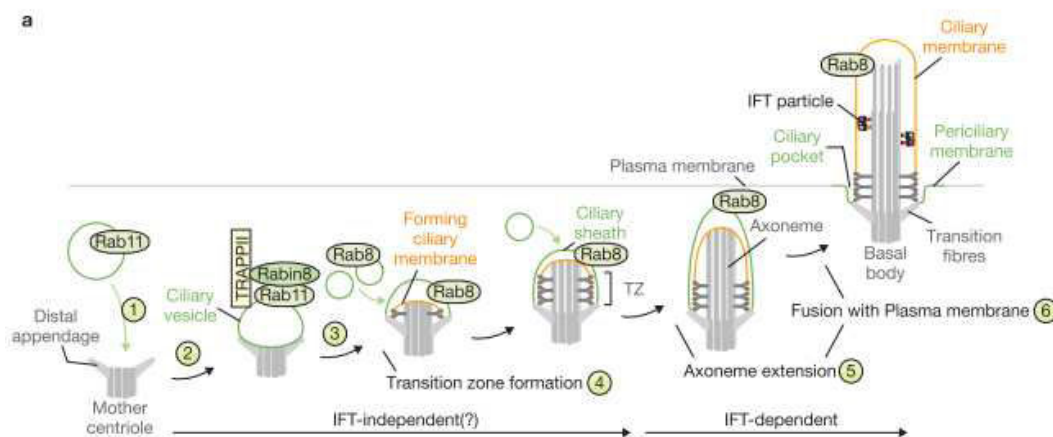


Figure 22 : Etapes de la ciliogénèse dépendantes de Rab8. Figure extraite de Sung & Leroux (2013).

Des vésicules secondaires véhiculant Smo sont aussi ciblées à l'extrémité distale du centriole père avant le début d'assemblage de l'axonème pour fusionner avec la vésicule primaire (Joo et al. 2013; Kim et al. 2010). Smo est situé au niveau de la membrane ciliaire lorsque ce dernier est totalement développé, favorisant son intervention dans la signalisation de la voie Hh. Ces résultats indiquent que ces vésicules pourraient apporter des futurs composants de la membrane du cil.

b. Rôle des protéines IFT

Le transport polarisé vers la base du cil peut aussi être pris en charge par certaines protéines IFT. C'est le cas de Ift20 notamment (Ishikawa & Marshall 2011). Ift20 est une protéine se situant à la fois au niveau de l'axonème et au niveau de l'appareil de Golgi (Follit et al. 2008; Follit et al. 2006). Au niveau de l'appareil de Golgi, elle collabore avec une protéine aussi localisée aux appendices distaux, Cep83 (CCDC41) pour la formation, le tri et le transport de vésicules ciliaires destinées au centrosome. Toutes deux, également localisées au corps basal, permettent l'ancrage de ce dernier avec la vésicule ciliaire (Joo et al. 2013).

B. Les microtubules impliqués dans le trafic de protéines cytosoliques

Les microtubules ancrés aux appendices subdistaux constituent de véritables rails pour faciliter le transport de protéines cytosoliques jusqu'à la base du cil. Ce transport aux centrioles s'avère être beaucoup plus rapide que la simple diffusion dans les extraits de *Xénope*. Afin d'atteindre le corps basal, plusieurs composants centriolaires ont besoin de deux éléments : d'une part des microtubules ancrés au corps basal via les appendices subdistaux, et d'autre part, du complexe de protéines motrices dynéine/dynactine (Young et al. 2000). En effet, la dépolymérisation des microtubules ou encore l'inhibition de l'ancrage des microtubules cause un défaut d'enrichissement de précurseurs ciliaires à la base du cil nécessaire pour la ciliogénèse. A titre d'exemple, EB1 (end-binding) et EB3, deux protéines de « tracking » localisent à la base du cil. Elles sont mises en jeu lors de la formation du cil à travers l'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux qui en retour facilitent le trafic de vésicules jusqu'à la base du cil. Les cellules déficientes en EB3 exhibent un réseau de microtubules désorganisés, accompagné d'une accumulation de vésicules autour du compartiment ciliaire. (Schrøder et al. 2007; Schrøder et al. 2011).

Quant au complexe dynéine/dynactine, il se révèle déterminant dans l'ancrage des microtubules au corps basal d'une part via p150^{Glued}, une sous-unité de la dynactine. D'autre part, l'association du complexe dynéine/dynactine avec la protéine PCM1 (Peri Centriolar Material 1), une protéine des satellites centriolaires est nécessaire pour la localisation de plusieurs composants des centrioles (la péricentrine, la ninéine, la centrine) impliqués dans l'ancrage des microtubules. L'inhibition de PCM1 résulte en une réduction de concentration des ces protéines au centrosome et à un défaut d'ancrage des microtubules.

PCM1 ainsi que Cep290, C2CD3, BBS4, péricentrine, OFD1, PAR6 α , Cep123, FOR20, Cep72, Talpid3 sont quelques exemples de satellites centriolaires impliqués dans l'assemblage du cil primaire, la plupart étant associés à des ciliopathies. Les satellites centriolaires sont morphologiquement caractérisés comme des petites granules sphériques d'un diamètre variant de 70 à 100 nm. Lors de la ciliogénèse, ces satellites sont regroupées autour du corps basal au niveau du compartiment pré-ciliaire (ou PCP : peri-centrosomal pre-ciliary compartment), une

structure observée dès les phases précoces de la ciliogénèse (Kim et al. 2010). A l'exception de PCM1, toutes se localisent aussi au sein au corps basal et/ou ont des fonctions au corps basal. La fonction des satellites centriolaires serait d'assurer l'enrichissement de précurseurs ciliaires à la base du cil, grâce à un transport actif dépendant du complexe dynéine/dynactine (Tollenaere et al. 2014).

C. Le BBSome, à l'interface de ces différents modes de trafic

Le BBSome est un autre acteur impliqué dans le trafic de composants ciliaires vers le cil primaire. Il participe aux deux modes de transport cités précédemment : le trafic de protéines membranaires et transmembranaires via les vésicules post-Golgi et le trafic de protéines cytosoliques via les microtubules ancrés au corps basal.

Découvert en 2007 à l'issue d'une purification biochimique, le BBSome se caractérise par un complexe de protéines stables et très conservées résidant à la base du cil: BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9, BIP10 à l'exception de BBS4 qui est un satellite centriolaire (Figure 23) (Nachury et al. 2007). Une mutation de la majorité des protéines de ce complexe ou de composants requis pour la régulation de son assemblage ou de son fonctionnement sont impliqués dans la survenue du syndrome de Bardet-Biedl. Celui-ci est caractérisé par une obésité, une dystrophie rétinienne, des malformations rénales, une polydactylie (Jin & Nachury 2007).

Son activité demeure énigmatique mais de nombreuses études convergent vers un rôle dans le trafic de cargos adressés au cil. Plus précisément, le BBSome est impliqué dans de nombreux processus comme la sélection de cargos, le trafic vésiculaire de protéines membranaires jusqu'au cil, l'ancrage et la fusion de vésicules à la base du cil et le transport IFT (Madhivanan & Aguilar 2014).

Outre Rab11, le BBSome se lie également à Rabin8 à la base du cil pour activer Rab8, qui une fois entrée dans le compartiment ciliaire, induira l'extension de la membrane ciliaire (Nachury et al. 2007). L'intégrité du BBSome est nécessaire pour la régulation de l'activité de Rab8, et des mutations de protéines du BBSome impliquées dans certaines ciliopathies affecterait l'activité de Rab8 (Hsiao et al. 2012).

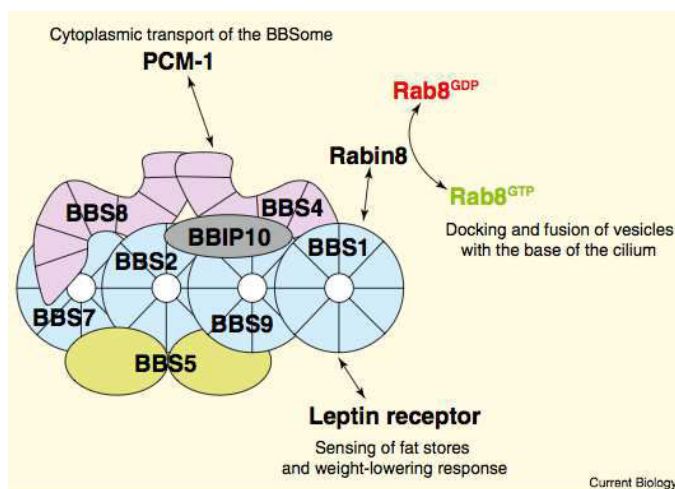


Figure 23 : Composition du BBSome. BBS4, localisant au niveau des satellites centriolaires, est capable de se lier avec PCM1. BBS1 en interagissant avec Rabin8 active Rab8 permettant l'ancrage et la fusion de vésicule à la base ciliaire.

Figure extraite de Jin & Nachury (2007)

La figure 24 résume les différents modes de trafic vers la base du cil (celui dépendant de la dynéine n'est pas représenté ici).

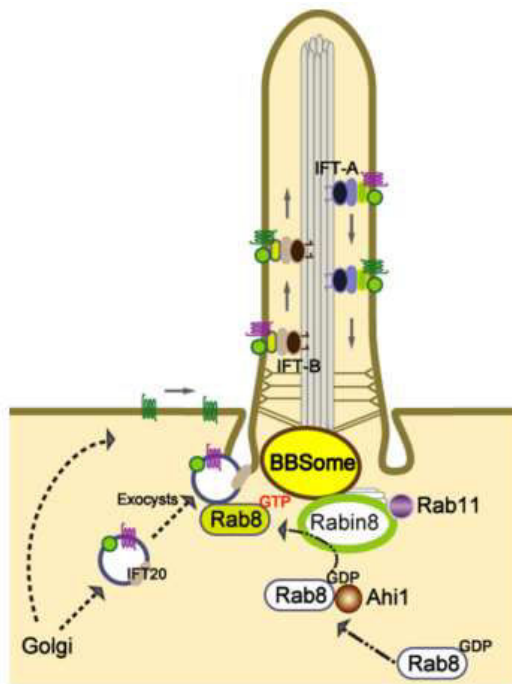


Figure 24 : Trafic polarisé de vésicules vers la base du cil, processus crucial pour la formation et la fonction du cil.

Même si le trafic de protéines solubles via le complexe dynéine/dynactine le long des microtubules ancrés aux appendices subdistaux/pieds basaux ne sont pas représentés ici, les autres mécanismes de trafic vésiculaires sont illustrés : les vésicules associées à Rab8/Rab11 ou aux protéines IFT comme Ift20. Les particules IFT associées au BBSome acheminent enfin les protéines ciliaires le long de l'axonème au niveau de la membrane du cil. Figure extraite de Hsiao et al. (2012).

Différents modes de transport sont donc possibles afin d'acheminer différents types de composants ciliaires vers la base du cil et l'identité des cargos impliqués commence à être bien élucidée. Il est évident que ces protéines n'arrivent pas aléatoirement jusqu'au cil. Seules les protéines nécessaires à la formation et à la fonction du cil seront transportées. Comment ces composants ciliaires sont-ils adressés à la base du cil ? Quels sont les signaux mis en jeu indiquant à la cellule que telle ou telle protéine doit être intégrée dans le cil ?

3. La barrière ciliaire

La base ciliaire joue un rôle de filtre, processus majeur pour l'assemblage du cil et la régulation sélective du contenu protéique ciliaire. En effet, la composition de la membrane ciliaire enveloppant l'axonème est singulière et différente de celle de la membrane plasmique. Cette caractéristique confère au cil un statut de compartiment unique et séparé du reste de la cellule. Le transport entre le cytoplasme et le cil doit ainsi être régulé afin de contrôler la concentration et la nature des composants ciliaires qui assurent la signalisation ciliaire. La régulation de l'entrée et de la sortie des protéines ciliaires dépendrait de protéines à la base du cil suggérant l'idée d'une barrière de diffusion qui empêche le mouvement non spécifique des protéines membranaires vers et en dehors du cil.

La barrière ciliaire se situe physiquement au niveau de la base du cil. Celle-ci permettant la modulation de l'entrée et sortie de molécules concernant les fibres de transition, le collier ciliaire, les fibres en forme de Y et les modules NPHP et MKS/JTBS au niveau de la zone de transition. D'autres structures associées au cil sont également requises dans le processus de

filtrage tels la machinerie de transport nucléo-cytoplasmique, l'anneau de septines, et la poche ciliaire (Figure 25).

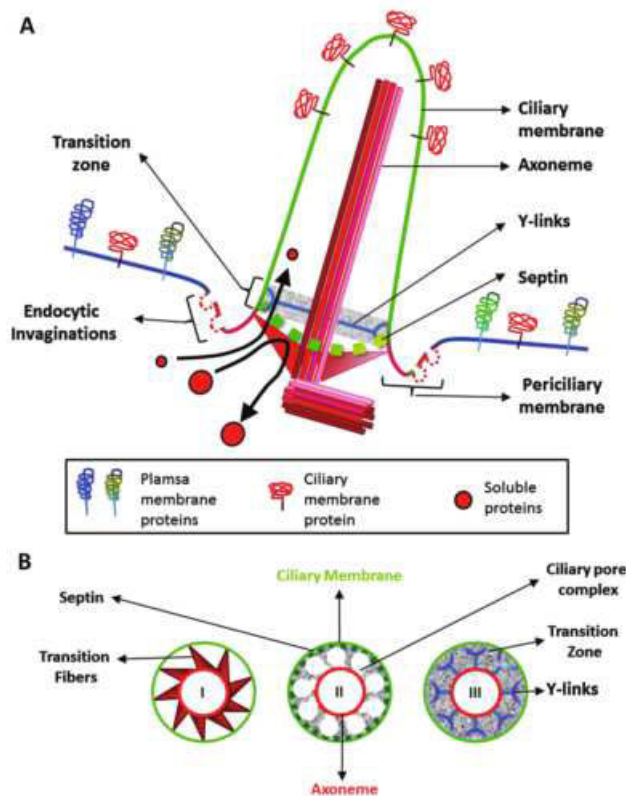


Figure 25 : Le cil est isolé du cytoplasme grâce à la barrière mise en place au niveau des fibres de transition, de la zone de transition, des pores ciliaires ainsi que les septines. Cette barrière confère à la membrane ciliaire une composition unique à la fois protéique et lipidique. Figure extraite de Madhivanan & Aguilar (2014).

Le mode opératoire de chaque structure responsable de la modulation du passage de composants ciliaires va être exposé dans la partie suivante. A l'heure actuelle, la façon dont ces événements sont mis en place dans l'espace et dans le temps, la façon dont ces structures coopèrent et assurent que la composition du cil reste optimale demeurent des questions encore non élucidées.

A. Rôle des fibres de transition

Les fibres de transition représentent un obstacle physique car l'espacement entre chaque fibre est trop mince pour permettre le passage de vésicules. En effet, ces dernières n'ont jamais été observées au sein du cil primaire. Ainsi, le point d'attachement à la membrane définit la limite à laquelle les vésicules destinées au cil peuvent fusionner. Cep164 ou Cep83 ont été identifiées pour leur fonction dans le recrutement des protéines IFT (Tanos et al. 2013; Cajánek & Nigg 2014; Joo et al. 2013; Schmidt et al. 2012). Des travaux chez *C. elegans* ont montré les mécanismes mis en jeu pour favoriser l'entrée des particules IFT à l'intérieur du compartiment ciliaire. DYF-19, (l'homologue humain de la protéine des fibres de transition FBF1) via l'interaction avec DYF-11 (l'homologue de IFT54) permet l'import ciliaire des particules assemblées au niveau des fibres de transition. Ces particules seront probablement ensuite prises en charges par le complexe de pore ciliaire (Wei et al. 2015; Wei et al. 2013).

B. Rôle de la zone de transition

Elle constitue à la fois un site d'ancrage pour les protéines destinées au cil, une région pour le transport actif et sélectif et une barrière de diffusion. A ce titre, les photorécepteurs représentent un modèle de référence pour observer la diffusion de la rhodopsine entre les deux segments interne et externe, la zone de transition étant le cil connecteur reliant ces deux compartiments. Il a été observé que la zone de transition limitait la diffusion de cette protéine (Reiter et al. 2012).

C. Rôle des modules NPHP et MKS/JTBS dans la barrière ciliaire

Trois modules fonctionnels et interconnectés ont été identifiés au niveau de la zone de transition mature jouant un rôle dans la ciliogénèse: le module néphronophtise « NPHP » composé de NPHP1/néphrocystine 1 contrôlant l'accès au cil des cargos et des particules IFT, le module de syndrome de Joubert « JBTS » contenant entre autre Cep290 essentiel pour la formation du cil, et le module de Meckel « MKS » incluant les protéines MKS1, MKS3/TMEM67 (ou meckeline), CC2D2A et TCNT2 impliquées dans le développement du tube neural et la signalisation Hh (Szymanska & Johnson 2012). Williams et collaborateurs ont caractérisé par exemple lors d'une étude des neurones sensoriels chez *C. elegans*, deux modules distincts mais fonctionnellement interactifs: MKS/MKSR (MKS1, B9D1/MKSR1, B9D2/MKSR2, MKS5/RPGRIPIL, MKS3/TMEM67, CC2D2A) et NPHP (NPHP1, NPHP4) partageant la même fonction biologique. Ces deux modules servent à la connexion du corps basal/zone de transition avec la membrane ainsi qu'à l'assemblage d'une zone de transition intacte. L'inhibition simultanée d'un composant de chaque module affecte la ciliogénèse causé par un défaut d'attachement entre la membrane et la zone de transition (Williams et al. 2011). Par ailleurs, un défaut de gènes appartenant aux modules NPHP et/ou MKS compromettant l'intégrité de la zone de transition peut causer une composition protéique ciliaire anormale (Craigie et al. 2010; Garcia-Gonzalo et al. 2011).

D. La poche ciliaire

La poche ciliaire, ou plus généralement la membrane péri-ciliaire, est un domaine membranaire unique présent à proximité de la base du cil. Sa formation est la conséquence de l'invagination de la vésicule ciliaire causée par la croissance d'une partie de l'axonème lors des phases cytoplasmiques de la ciliogénèse. Si le rôle de la poche ciliaire reste à clarifier, plusieurs études réalisées dans différents modèles, s'accordent sur le fait qu'elle agit comme une plateforme associée au cil pour faciliter le trafic vers et en dehors du cil. De plus, il est clairement observé que la poche crée un site d'ancrage pour les filaments d'actine (Benmerah 2012; Ghossoub et al. 2011).

Une des particularités de la poche ciliaire est la présence de puits recouverts de clathrine indiquant sa spécialisation dans le processus d'endocytose. Son étonnante ressemblance structurale avec la poche flagellaire présente chez le trypanosome, caractérisée comme un site d'endocytose, suggère une similarité fonctionnelle, renforçant cette hypothèse. Chez l'Homme, cette activité endocytaire active pourrait être impliquée dans l'internalisation de composants ciliaires visant à être éliminés ou recyclés pour cause d'excès ou de ciblage incorrect. Etant donné sa position stratégique à proximité des rails de microtubules ancrés aux appendices

subdistaux et l'appareil de Golgi, il est également probable que la poche ciliaire puisse agir comme une plateforme de vésicules sécrétoires dont le contenu pourrait se déverser dans la lumière de la poche et ainsi être libéré dans le milieu extérieur, fonctionnant de fait comme un réservoir (Molla-Herman et al. 2010).

Enfin, son rôle de plateforme s'illustre aussi dans sa capacité à établir des contacts avec les filaments d'actine créant ainsi un lien entre le cytosquelette et le cil primaire. Les filaments d'actine, considérés comme des éléments structuraux, pourraient favoriser la formation et le maintien de l'environnement local de la poche et contrôler la morphologie de la poche ciliaire. Ces câbles d'actine dont certains sont stables et d'autres plus dynamiques interviendraient également dans le positionnement et la fonction du cil.

Dans ce chapitre ont été détaillées toutes les étapes cytoplasmiques du programme ciliogénique aboutissant à la croissance du cil. Toutes sauf une : l'étape concernant la migration et l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. En effet, les connaissances sur cette étape demeurent encore très fragmentaires. Le cytosquelette d'actine semble être un des acteurs clés de la migration du corps basal puisque sa déstabilisation est reconnue comme un inducteur de la ciliogénèse. Cependant, les acteurs moléculaires régulant la cette étape restent encore incompris. La caractérisation de cette étape est l'objet de notre problématique.

III. Les forces exercées par le cytosquelette pour le positionnement du centrosome

Lors de la ciliogénèse, le corps basal, issu de la différenciation du centriole père, sert de base structurale et fonctionnelle au cil primaire. Ancré à la membrane apicale, il permet la nucléation des microtubules qui formeront l'axonème du cil primaire. Associé étroitement avec le centriole fils, et entouré du matériel péri-centriolaire, il forme le centrosome. S'il est indispensable pour la genèse des cils et des flagelles, le centrosome participe également à d'autres processus cellulaires comme l'établissement de la polarité, le trafic intracellulaire, la migration directionnelle des cellules, l'orientation du fuseau mitotique, le positionnement d'autres organelles au sein de la cellule etc. Le positionnement du centrosome n'est jamais aléatoire, il correspond à une fonction dédiée.

1. Le centrosome : un organe connecté

A. Connexion du centrosome avec le cytosquelette

Le centrosome constitue un centre organisateur des microtubules ou MTOC (microtubule organizing center). Les microtubules sont nucléés grâce à la présence de tubuline gamma formant avec d'autres protéines, le complexe gamma TuRC (gamma tubulin ring complexes). Une fois nucléés, les microtubules sont ensuite ancrés à des sites spécifiques comme les appendices subdistaux ou relâchés loin du centrosome (Figure 26) (Bornens 2002).

A l'instar des filaments d'actine et des filaments intermédiaires, la distribution des microtubules n'est pas aléatoire. Un réseau de microtubules se forme et s'organise en aster polarisé. Les bouts « - », extrémités des microtubules les moins dynamiques, sont ancrés et stabilisés au centrosome, tandis que les bouts « + », plus dynamiques, polymérisent et se dirigent vers la périphérie de la cellule.

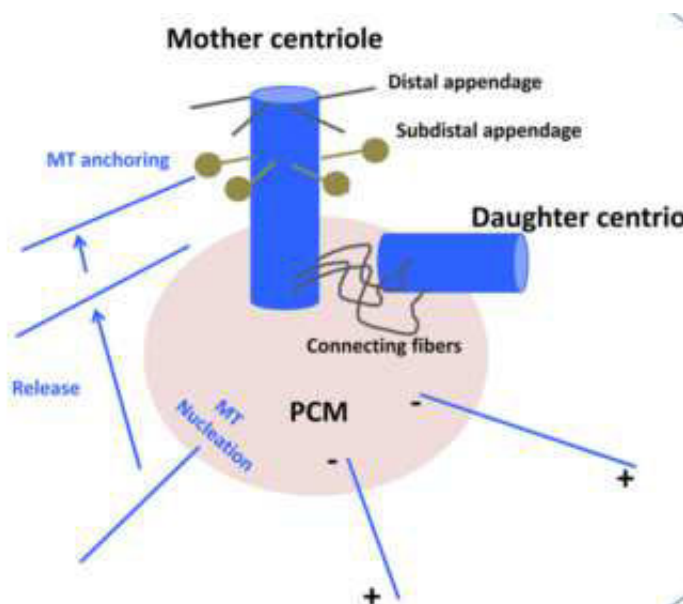


Figure 26 : Nucléation, relâche et ancrage des microtubules.

Les microtubules sont nucléés à partir de la matrice péri-centriolaire. Après leur relâche, ils peuvent être soit ancrés aux appendices subdistaux, soit définitivement libérés dans le cytoplasme. L'aster de microtubules est polarisé, les bouts « - » ancrés au centrosome et les bouts « + » orientés vers la périphérie de la cellule. Figure extraite de Kloc et al. (2013).

Comme vu dans le 2ème chapitre, la dynéine, moteur moléculaire associé aux microtubules, joue un rôle essentiel dans la connexion entre les bouts « -> » des microtubules et les appendices subdistaux du centriole père (Kodani et al. 2013). Elle est par ailleurs impliquée dans le trafic intracellulaire, qui à l'inverse de la kinésine, se déplace le long des microtubules vers le bout « -> ».

Les microtubules émanant du centrosome explorent ainsi tout l'espace intracellulaire. Ils captent, sentent, sondent et collectent toutes les informations issues de la membrane cellulaire mais aussi issues de certaines organelles avec lesquelles il est connecté, comme le noyau et l'appareil de Golgi. Le centrosome intègre et collecte tous les signaux pouvant déclencher une réponse cellulaire comme la réorientation du centrosome par exemple.

Connecté au réseau de microtubules, le centrosome est aussi associé aux filaments intermédiaires et au cytosquelette d'actine. Il a été rapporté dans les années 1990 que la vimentine était organisée en réseau à proximité du centrosome et plus particulièrement, elle serait attachée au centrosome via des protéines du PCM (Trevor et al. 1995). Un centre organisateur de filaments intermédiaires a même été évoqué. Cependant, de part les difficultés techniques pour les observer, cette hypothèse reste encore controversée et il subsiste encore des zones d'ombre concernant la nature et la fonction de cette association avec le centrosome.

Plus récemment, des études protéomiques révèlent la présence de protéines de liaison à l'actine au centrosome. Hubert et collaborateurs observent par immunofluorescence, la co-localisation de la tubuline gamma (marqueur du centrosome) avec le complexe Arp2/3, impliqué dans la nucléation des filaments d'actine. Ils parviennent même à distinguer des filaments d'actine émanant du centrosome. La purification de centrosomes a permis de pallier la difficulté d'observer une possible interaction entre cette organelle et le cytosquelette d'actine puisque tout le cytosquelette de la cellule est éliminé. De façon surprenante et originale, il a été démontré dans notre laboratoire que le centrosome n'est pas qu'un centre organisateur de microtubules mais aussi un centre organisateur d'actine (Farina et al 2015).

B. Connexion du centrosome avec d'autres organites intracellulaires

Dans les cellules en interphase, le centrosome est fortement connecté avec le noyau et l'appareil de Golgi. Ces connexions établissent des liens non seulement physiques mais aussi fonctionnels (Figure 27).

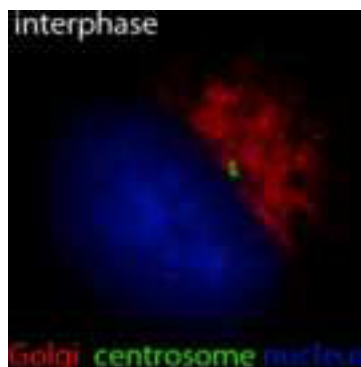


Figure 27: Photos de cellules en interphase illustrant la proximité physique du centrosome (vert) avec l'appareil de Golgi (rouge) et le noyau (bleu)
Figure extraite de Sütterlin & Colanzi (2010).

a. Connexion avec le noyau

Le centrosome interagit étroitement avec le noyau. En effet, ce lien est assez robuste pour résister à la lyse cellulaire et à l'isolement du noyau (Bornens 2012). Il est permis grâce à l'association de plusieurs protéines formant le complexe LINC (linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton). Ces protéines situées au niveau de la membrane interne et externe de l'enveloppe nucléaire relient le cytosquelette du noyau (ou lamina nucléaire) aux trois éléments du cytosquelette cytoplasmique : les microtubules, l'actine et les filaments intermédiaires Figure 28).

Différentes protéines nommées nesprines (Nuclear Envelope Spectrin repeat proteins) sont ancrées dans les deux membranes de l'enveloppe nucléaire via leur domaine transmembranaire situé en C terminal, nommé KASH (Klarsicht/ANC-1/Syne homology). Elles sont par ailleurs en contact direct avec le cytosquelette de part leur extension cytoplasmique grâce à la présence de différents motifs en N terminal. Chez les vertébrés, les nesprines possèdent différentes spécificités d'interaction avec le cytosquelette : les nesprines « Giant » 1 et 2 se lient essentiellement à l'actine mais aussi avec le réseau de microtubules (directement ou indirectement), la nesprine 3 avec les filaments intermédiaires via la plectine, et la nesprine 4 indirectement avec les microtubules émanant du centrosome via la kinésine (Gerlitz & Bustin 2011; Mellad et al. 2011).

Les nesprines sont recrutées à l'enveloppe nucléaire par deux protéines SUN (SUN : Sad1-UNC84): SUN1 et SUN2 qui sont les plus exprimées dans les cellules de mammifères. Elles occupent l'espace périnucléaire situé entre les deux membranes de l'enveloppe nucléaire et sont connectées avec la lamina nucléaire via les protéines comme l'émerine, la lamine de type A et des protéines de liaison avec la chromatine (Chang et al. 2015). Ainsi le complexe LINC permet de relier physiquement le cytosquelette nucléaire (via les protéines SUN) au cytosquelette cytoplasmique (via les nesprines).

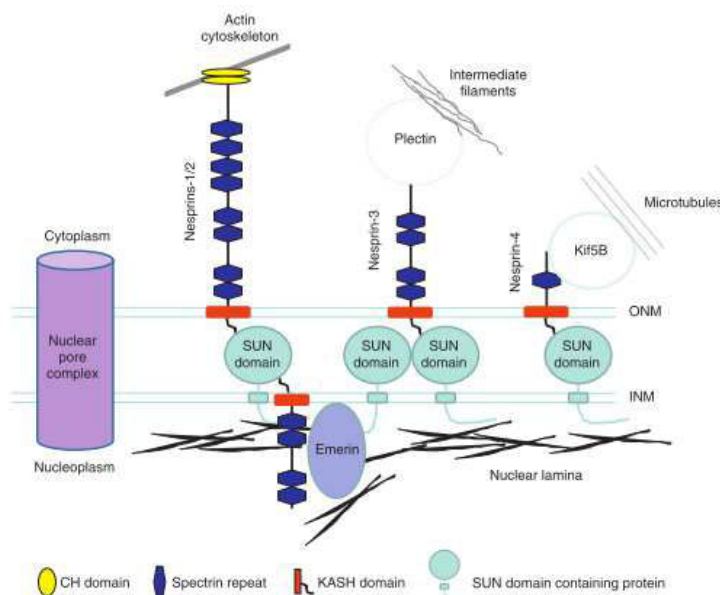


Figure 28 : Schéma illustrant le complexe LINC permettant la connexion entre le noyau et les trois réseaux du cytosquelette. Figure extraite de Mellad et al. (2011).

Outre les protéines nesprines 1, 2 et 4, d'autres protéines connectent directement le noyau avec le centrosome. Par exemple, l'émerine, une protéine située dans la lamina nucléaire est capable de connecter directement le noyau avec le centrosome. En effet, une fraction de cette

protéine se situe également au niveau de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire et se lie directement avec la tubuline bêta des microtubules (Salpingidou et al. 2007).

Un des rôles joués par le complexe LINC est de faciliter la connexion noyau/centrosome et de réguler la distance entre ces deux organelles. Deux exemples, témoignent de l'importance de cette connexion pour le bon fonctionnement de l'organisme. Il a été rapporté que les nesprines 1 et 2 interagissent avec les microtubules par le biais du complexe dynéine/dynactine et de la kinésine, rapprochant ou éloignant respectivement le noyau du centrosome (Figure 29). Ces interactions influencent ainsi la distance entre le noyau et le centrosome, nécessaire notamment lors de la migration neuronale dans le cerveau murin en développement. En effet, la déplétion simultanée des nesprines 1 et 2 entraîne la mort périnatale de ces souris, causée par un détachement du couple noyau/centrosome. Le défaut de migration neuronale consécutif à cette distance augmentée entre les deux organelles explique les anomalies du développement cérébral (Zhang et al. 2009).

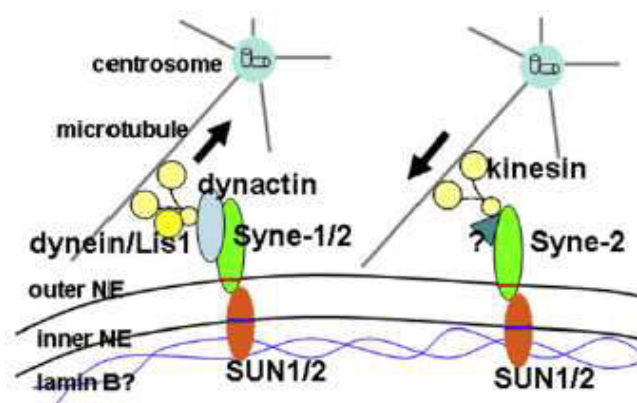


Figure 29: Modèle illustrant les forces exercées par les microtubules sur l'enveloppe du noyau via le complexe dynéine/dynactine et la kinésine. Les protéines SUN1 et SUN2, connectées à la lamine B interagissent avec les nesprine 1/Syne-1 et nesprine 2/Syne-2. Lors de la migration neuronale et à certains moments du cycle cellulaire, elles interagissent soit avec le complexe dynéine/dynactine afin de rapprocher le noyau du centrosome, soit avec la kinésine afin d'éloigner ces deux organelles. *Figure extraite de Zhang et al. (2009).*

Un défaut d'un des composants du complexe LINC peut causer une force de transmission altérée entre le cytosquelette et le noyau et ainsi contribuer au développement de dystrophies et de cardiomyopathies dilatées appartenant au groupe des laminopathies (Hale et al. 2008; Lombardi et al. 2011). Dans ces situations, la sensibilité des cellules au stress mécanique est nettement augmentée résultant en l'activation de réponse au stress et même de voies apoptotiques (Gundersen & Worman 2013). De façon plus précise, l'inhibition des protéines émerine et lamine de type A individuellement dans les fibroblastes embryonnaires de souris résulte en une augmentation de la distance noyau/centrosome (Hale et al. 2008; Salpingidou et al. 2007).

En lien étroit avec le centrosome, la position des deux organelles est interdépendante, un mouvement du noyau peut entraîner un déplacement du centrosome et *vice versa*.

b. Connexion avec l'appareil de Golgi

Dans les cellules non polarisées en interphase, l'appareil de Golgi, tout comme le réticulum endoplasmique, se situe à proximité du centrosome dans la zone périnucléaire. Il prend l'aspect d'un ruban de lamelles ou citernes aplaties, interconnectées les unes aux autres.

La relation entre le centrosome et l'appareil de Golgi s'étend au delà de la proximité physique et implique des interactions fonctionnelles. De nombreux contextes cellulaires nécessitent un positionnement de l'appareil de Golgi adjacent au centrosome, afin de polariser le trafic vers une localisation bien définie (le front avant pour une cellule en migration, le corps basal ancré à la membrane plasmique lors de la ciliogénèse etc.).

Chez les mammifères, cette localisation non aléatoire du ruban Golgien près du centrosome nécessite à la fois l'intervention du réseau de microtubules et le cytosquelette d'actine. Le réseau de microtubules permet la maintenance structurale du ruban de l'appareil de Golgi, mais aussi son positionnement. Ces mécanismes sont guidés par la dynéine, son absence résultant en la fragmentation et la dispersion dans le cytoplasme des fragments et un défaut de positionnement de l'appareil de Golgi (Harada et al. 1998). Les kinésines, localisées à l'appareil de Golgi, entrent aussi en jeu (Barker et al. 2015). Par ailleurs, l'appareil de Golgi est capable de nucléer des microtubules dont la dynamique et l'orientation diffèrent de ceux provenant du centrosome. En effet, contrairement aux microtubules centrosomaux qui forment un aster, ceux de l'appareil de Golgi s'orientent préférentiellement vers le front avant d'une cellule en migration afin de faciliter l'apport de composants nécessaires à la migration (Miller et al. 2009). Enfin, des filaments d'actine localisées au niveau de l'appareil de Golgi interviendraient également dans la maintenance de la position péricentriolaire de l'appareil de Golgi (Sütterlin & Colanzi 2010a).

2. Repositionnement du centrosome lors de polarisation cellulaire

A. Polarité cellulaire: définition

La polarité cellulaire désigne l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'organisation asymétrique structurale et fonctionnelle de la cellule. La distribution asymétrique de protéines, de lipides, d'ARN et des organites cellulaires comme le noyau, le centrosome et l'appareil de Golgi est nécessaire pour la détermination du devenir de la cellule, la différenciation, la division...

La cellule polarisée se caractérise par la formation de deux domaines exclusifs mais structurellement associés, distincts en terme de composition lipidique et protéique. Leur position relative est associée à la localisation non aléatoire du couple noyau/centrosome, définissant ainsi un axe de polarité, observé en 1883 par Van Beneden (Figure 30 a). Par ailleurs, la position du centrosome définit un centre et une périphérie. Dans de nombreux types cellulaires cultivés *in vitro* en interphase, le centrosome se trouve au centroïde ou centre géométrique de la cellule (Dujardin, Vallee 2002).

Cet axe est observé dans les cellules dites « non polarisées ». En effet, une cellule est en réalité toujours polarisée dans le sens où le trafic et le cytosquelette sont intrinsèquement polarisés. La nucléation des microtubules par le centrosome est symétrique, mais du fait de la présence d'un obstacle physique dû à la présence du noyau, la croissance des microtubules tend à s'orienter vers l'avant de la cellule (côté opposé au noyau). De plus, l'appareil de Golgi étant en étroite association avec le centrosome, le trafic intracellulaire empruntant les rails formés par les microtubules est par conséquent polarisé vers l'avant de la cellule (Figure 30 b) (G W Gant Luxton & Gundersen 2011).

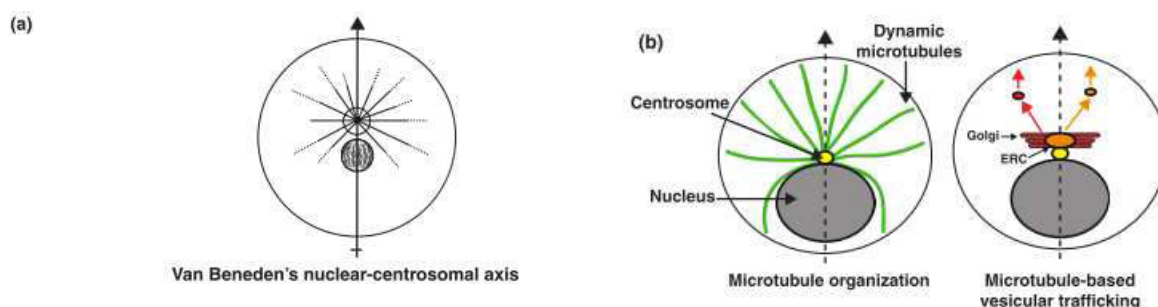


Figure 30 : Organisation intracellulaire

a/ Dessin de Van Beneden illustrant l'axe noyau/centrosome. Celui-ci définit un axe de polarité interne à la cellule

b/ La présence physique du noyau affecte la distribution spatiale des microtubules naissant au centrosome et irradiant le cytoplasme. Du fait de l'organisation anisotrope des microtubules, le transport vésiculaire issu de l'appareil de Golgi est polarisé.

Figure extraite de G. W Gant Luxton & Gundersen (2011).

Si le phénomène de polarisation est observable dans une cellule « non polarisée », il est d'autant plus remarquable en réponse à différents stimuli internes ou externes (contacts cellule/cellule, facteurs de croissance, matrice extracellulaire), car il s'accompagne de changements morphologiques importants comme la formation de domaines asymétriques.

Dans la majorité des types cellulaires, cette polarité morphologique est associée à un alignement de l'axe noyau/centrosome contribuant à l'établissement et à la maintenance de la polarité (G W Gant Luxton & Gundersen 2011). L'orientation de l'axe noyau/centrosome lors de la polarisation implique un repositionnement du noyau mais aussi, plus particulièrement un repositionnement du centrosome grâce à d'importants réarrangements du cytosquelette.

B. Polarisation du centrosome dans différents contextes cellulaires

Le positionnement du centrosome n'est pas aléatoire et un défaut de localisation conduit à la survenue de désordres cellulaires pouvant même causer des pathologies. L'objectif de ma thèse est de décrypter les mécanismes régulant le positionnement du centrosome lors de la ciliogénèse, car ils sont peu documentés à l'heure actuelle. En revanche, ceux régissant la réorientation du centrosome lors d'autres processus biologiques comme la migration, la division ou encore la formation de la synapse immunologique sont bien décrits et peuvent être source d'inspiration. Ces trois modèles seront présentés ci-après. Dans un premier temps, l'organisation du cytosquelette ainsi que la position du centrosome seront décrites dans les trois processus biologiques polarisés. Les acteurs induisant la polarité, impliqués dans la régulation du mouvement du centrosome, seront exposés dans la partie suivante.

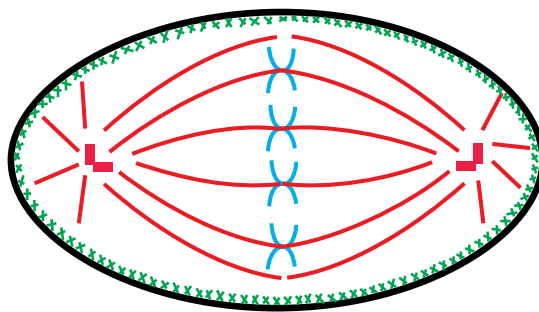
Chaque modèle permet d'apporter des pièces au puzzle. Bien que les voies de signalisation contrôlant le positionnement du centrosome diffèrent selon la nature du signal et le type cellulaire, les différents systèmes montrent des similitudes évidentes, à la fois dans les molécules de signalisation impliquées, et dans les mécanismes responsables du mouvement du centrosome. En effet, tous requièrent la réorganisation du cytosquelette et la participation de moteurs moléculaires. La différenciation des cellules épithéliales ciliées étant aussi associée au remodelage du cytosquelette, certains acteurs peuvent être similaires.

a. Cas de la division cellulaire

Lors de l'engagement des cellules en mitose, les centrosomes préalablement dupliqués, s'orientent vers chacun des pôles de la cellule. Les microtubules nucléés sont alors très dynamiques. Ils forment une structure spécifique dédiée à la ségrégation des chromosomes, assurant ainsi une répartition égale du matériel génétique dans les deux cellules filles (Figure 33) (Wittmann et al. 2001). Bien qu'ils ne soient pas indispensables au processus mitotique, les centrosomes sont en revanche essentiels pour la détermination de l'orientation du fuseau mitotique.

Dans le cas de la division, l'axe noyau/centrosome n'est plus évoqué, c'est l'axe défini par la position des deux centrosomes relatif aux pôles de la cellule ou du tissu qui prime et qui détermine l'orientation du fuseau, et ainsi le type de division. Qu'elles soient symétriques ou asymétriques, les divisions contribuent à générer des cellules correctement disposées pour former un tissu avec une cohérence structurale et fonctionnelle (Noatynska et al. 2012).

Concernant l'organisation du cytosquelette, l'actine subit un réarrangement drastique associé à une augmentation de la rigidité corticale conférant à la cellule sa forme arrondie caractéristique (Heng & Koh 2010). Quant aux microtubules, ils s'orientent à la fois vers le centre de la cellule pour interagir avec les chromosomes via les kinétochores et vers le cortex. Les microtubules astraux (ceux qui sont dirigés vers le cortex) connectent le fuseau mitotique au cortex et contrôlent ainsi son orientation.



axe de
division

Figure 31: Cellule en cours de mitose.

Ces exemples illustrent l'importance du remodelage du cytosquelette et du positionnement du centrosome lors de différents processus biologiques. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes mis en jeu lors du repositionnement du centrosome.

b. Cas de la migration cellulaire

La polarisation d'une cellule en migration se définit ici par la présence de deux domaines structuralement et fonctionnellement opposés: le front avant de migration et le front arrière de rétraction (Figure 31). Ces deux domaines sont organisés en réseaux spécifiques constitués de deux grandes structures d'actine. Le front avant, orienté dans le sens de la migration, se compose de protrusions membranaires. Cette région est appelée lamellipode et est constituée de réseaux de filaments d'actine dits « branchés ». Ce domaine assure ainsi une large surface de contact avec la matrice extracellulaire. Alors qu'à l'avant de la cellule, les filaments d'actine sont en constante polymérisation pour générer l'extension de la membrane, au front arrière de la cellule, les filaments sont organisés en fibres contractiles ou fibres de stress. Décorés par la

myosine II, ils induisent le désassemblage des filaments d'actine, permettant la rétractation de la cellule et le détachement des adhésions du support (Vicente-Manzanares et al. 2005). Les adhésions focales, véritables senseurs de la rigidité de la matrice extracellulaire subissent un processus de maturation en adhésions focales.

Quant au réseau de microtubules, il est également orienté vers le front avant et cible les adhésions focales. La réorientation de ce réseau régule le trafic et est couplé avec le repositionnement des microtubules issus de l'appareil de Golgi vers le front de migration (Efimov et al. 2007).

Le centrosome se situe dans la majorité des types cellulaires entre le noyau et le front avant, s'orientant ainsi dans le sens de la migration. Il favorise ainsi la direction préférentielle des bouts « + » des microtubules le long de l'axe de migration vers ce même domaine pour l'apport de vésicules, ARNm et protéines. Même si plusieurs études attribuent un rôle leader du centrosome dans la coordination de la migration directionnelle, certains types cellulaires comme les cellules Ptk (male rat kangaroo kidney epithelial cells), les leucocytes et les cellules neuronales de poissons zèbres (expérience *in vivo*) font exception à la règle. En effet, le centrosome étant observé à l'arrière du noyau, l'axe noyau/centrosome ne corrèle donc pas avec la direction de la migration (Distel et al. 2010; Yvon et al. 2002; Stinchcombe & Griffiths 2014).

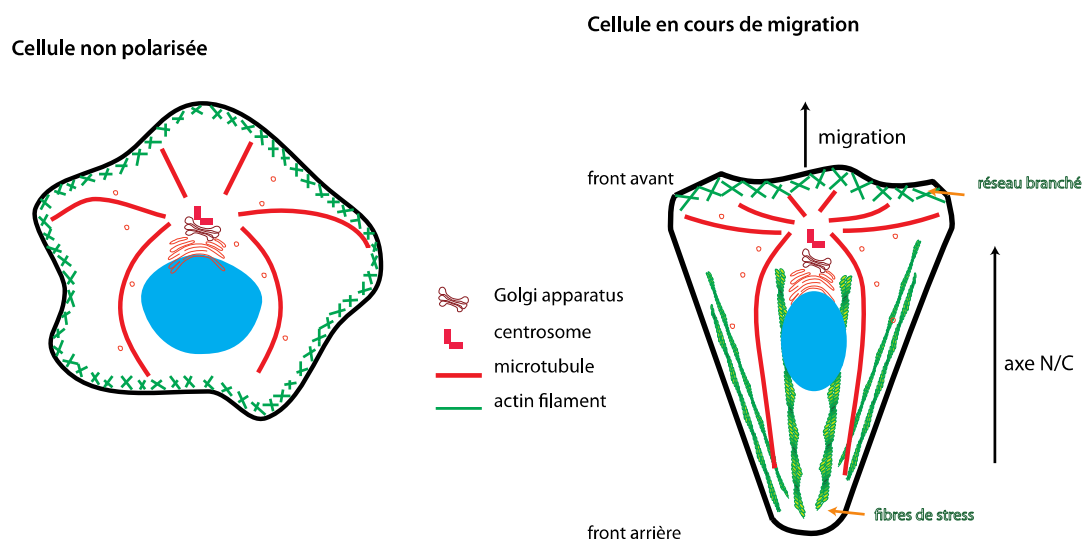


Figure 32 : Réorganisation du cytosquelette dans les cellules en migration

Vues de dessus

A gauche : cellule non stimulée

A droite : cellule polarisée en cours de migration. Le centrosome se situe dans la majeure partie des types cellulaires entre le noyau et le front avant, créant un axe noyau/centrosome dirigé vers le front de migration.

c. Cas de la formation d'une synapse immunologique

L'intérêt de ce modèle porte sur le fait de sa similitude morphologique, moléculaire et fonctionnelle avec la cellule ciliée. De fait, la synapse immunologique pourrait représenter un cil modifié, même si elle est incapable de former un cil primaire (Stinchcombe & Griffiths 2014; Reiter & Griffiths 2013).

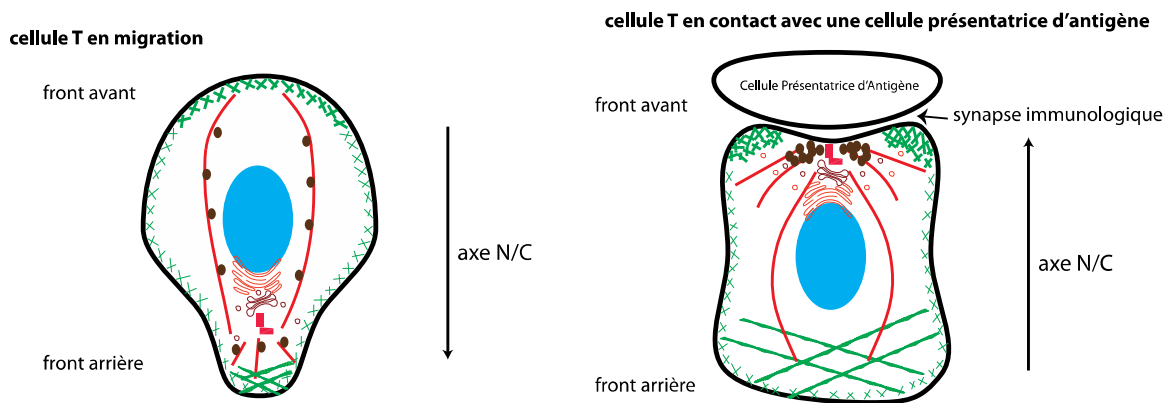


Figure 33 : Réorganisation du cytosquelette dans les lymphocytes

A gauche : lymphocyte T non stimulé en cours de migration.

A droite : suite à un contact du lymphocyte T avec une cellule cible ou une cellule présentatrice d'un antigène.

L'interaction d'un lymphocyte (cellule NK ou lymphocyte T) avec une cellule infectée déclenche la destruction rapide de la cellule cible ou de la cellule présentatrice d'antigène grâce au relargage de protéines lytiques. Très rapidement, le site de contact se réorganise pour former la synapse immunologique (Figure 32). La polarisation de la machinerie sécrétoire implique un réarrangement important du cytosquelette qui s'oriente alors vers la cellule cible. L'événement le plus remarquable concerne la réorientation du centrosome à la synapse. Alors qu'il est positionné derrière le noyau dans les cellules en migration, il est soudainement transloqué depuis l'uropode jusqu'au contact de la région synaptique en quelques minutes. Cet événement est donc crucial pour le transport des granules cytotoxiques le long des microtubules eux aussi réorientés (Stinchcombe & Griffiths 2014; Ritter et al. 2013).

Le cytosquelette subit également un réarrangement. Une contraction des filaments d'actine induite par la présence de la myosine II à l'arrière de la cellule a été rapportée (Liu et al. 2013). De façon plus localisée, la synapse immunologique est dépourvue d'actine corticale au moment du contact avec la cellule cible et avant la migration du centrosome (Ritter et al. 2015).

3. Mécanismes impliqués dans le centrage et le décentrage du centrosome

A. Différentes forces appliquées au centrosome

Comme vu précédemment, les cellules non stimulées (ou non polarisées) possèdent un centrosome situé au centre géométrique de la cellule. Cette position non aléatoire dite de centrage est maintenue grâce à différents types de forces antagonistes exercées par le cytosquelette.

Un des papiers phares révélant l'implication des trois forces sur le centrage du centrosome est celui de Burakov et collaborateurs en 2003. Travaillant avec des cellules BS-C-1 (cellules rénales de singe) en interphase, ils ont utilisé différents perturbateurs du cytosquelette et observé les conséquences sur le positionnement du centrosome initialement centré. Ils confirment dans cette étude l'intervention des deux types de forces dépendantes des microtubules dites de **traction** (« pulling force ») et de **poussée** (« pushing force ») ainsi qu'une

force de poussée centripète dépendante du cytosquelette d'actine (Figure 34) (Burakov et al. 2003).

La croissance des bouts « + » des microtubules est à l'origine des forces de poussée. En effet, lorsque les microtubules poussent la membrane en polymérisant, une force mécanique est créée en retour, déplaçant par conséquent le centrosome dans la direction opposée. Les forces de traction sont générées par les dynéines sur les microtubules. Ancrées au cortex ou réparties dans le cytoplasme, en se déplaçant vers l'extrémité « - » des microtubules, elles tirent sur les microtubules. La contractilité des filaments d'actine induite par la myosine II joue également un rôle, apparemment moins prédominant, dans le positionnement du centrosome. Elle tend à centrer le centrosome.

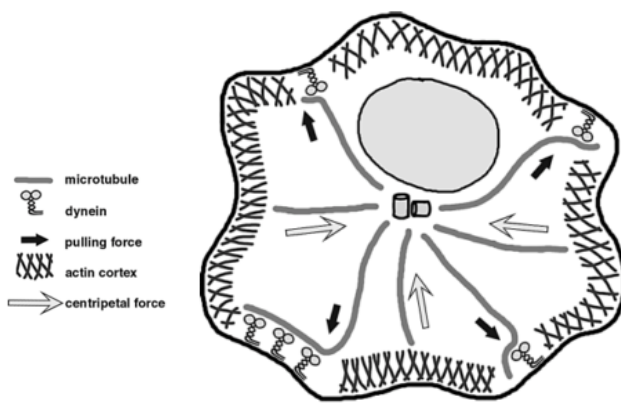


Figure 34 : Cellule en interphase. La position centrée du centrosome est la résultante d'un équilibre entre 3 types de forces. Figure extraite de Burakov et al. (2003).

a. Forces exercées par les microtubules

Instabilité dynamique et régulation de la dynamique des microtubules

Les forces générées par les microtubules sur le centrosome sont très étudiées. Qu'elles soient de poussée ou de traction, elles peuvent être modulées du fait de la dynamique intrinsèque des microtubules.

Les microtubules ont une croissance polarisée puisque chacune de leur extrémité montre des vitesses de polymérisation différentes. A l'inverse des bouts « - » ancrés et stabilisés au centrosome, les bouts « + » explorant le cytoplasme sont dynamiques, ils peuvent alterner de façon aléatoire entre une longue phase de croissance et une phase de dépolymérisation plus rapide. Cette dynamique génère ainsi d'importantes fluctuations dans la longueur des microtubules. Ce comportement appelé **instabilité dynamique**, implique des phases dites de catastrophes (transition entre croissance et dépolymérisation) et à l'inverse des phases dites de sauvetage ou « rescue » (Figure 35) (Mitchison & Kirschner 1984).

Cette propriété d'instabilité dynamique permet aux microtubules d'explorer l'espace cellulaire, afin d'interagir avec différents partenaires comme le cortex où ils pourront être capturés. L'ancrage spécifique des bouts « + » de microtubules au cortex ainsi que la réorganisation du réseau de microtubules représentent une étape indispensable au processus de polarisation.

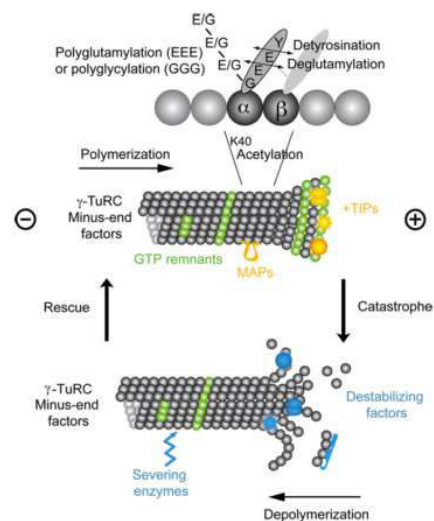


Figure 35 : Instabilité dynamique des microtubules et régulation de leur dynamique

La croissance des microtubule est due à l'addition de tubuline à l'extrémité « + » (en haut de l'image) alors que la dépolymérisation est due à la dissociation d'oligomères (phase de raccourcissement) (en bas de l'image). Les transitions d'un état à un autres sont appelées catastrophe et sauvetage. Figure extraite de De Forges et al. (2012).

Par ailleurs, la dynamique des microtubules est sous le contrôle de protéines s'associant spécifiquement aux bouts « + » ou « - ». Certaines protéines appartenant à la famille des MAPs (microtubule-associated proteins) se lient aux microtubules et régulent la dynamique des microtubules en les stabilisant. C'est le cas des protéines Tau, MAP2, MAP4, les deux premières étant plus fortement exprimées dans les cellules neuronales. Une famille particulière des MAPs concerne les protéines appelées +TIPS (microtubules plus-end tracking proteins). Elles ont la particularité de se lier spécifiquement aux bouts « + » des microtubules en croissance. Dans cette catégorie, nombreuses sont celles qui sont impliquées dans la stabilisation des microtubules en les connectant au cortex. On peut citer les CLASPs (cytoplasmic linker protein-associated proteins), ACF7 (ATP dependent chromatin assembly and remodelling factor 7), toutes deux stabilisent les microtubules au cortex, ou encore APC (adenomatous polyposis coli). Quand aux protéines EB1 et EB3 de la famille EB (end-binding), elles empêcheraient les phénomènes de catastrophes (van der Vaart et al. 2009).

Les dynéines jouent également un rôle non négligeable dans la dynamique des microtubules. Elles se lient aux extrémités « + » des microtubules et peuvent réguler leur dynamique, de façon opposée selon les contextes (Laan et al. 2012; Hendricks et al. 2012). Dans certains cas, elles permettent le regroupement et la capture des microtubules au cortex notamment. Ainsi, elles retarderaient les phénomènes de catastrophes, stabilisant les bouts « + » des microtubules, exerçant par conséquent une tension sur les microtubules (Hendricks et al. 2012).

D'autres facteurs sont plus spécifiquement impliqués dans le désassemblage des microtubules comme certaines MAPs, la famille des kinésine 13 (Kif2A, Kif2B et Kif2C), des kinésine-8s, des kinésines 14s, la stathmine etc.

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline régulent aussi la dynamique des microtubules et participent à la polarisation du réseau de microtubules. Les détyrosinations, glutamylations, acétylations ou encore glycylation sont généralement couplées à une augmentation de la stabilité des microtubules du fait de leur capacité à recruter des MAPs ou en affectant l'activité des moteurs liés aux microtubules. A titre d'exemple, la tyrosination de la tubuline favorise le recrutement de facteurs stabilisant ou encore l'interaction notamment avec p150^{glued}, une sous unité de la dynactine associée à la dynéine (De Forges et al. 2012). L'acétylation de la tubuline a également été rapportée lors de polarisation de cellules comme la

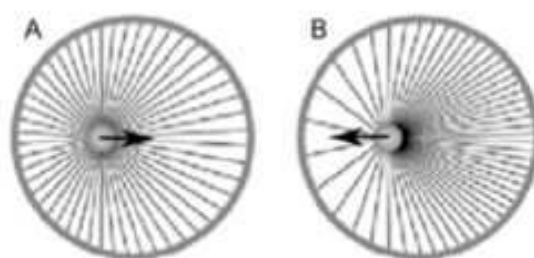
formation d'axones ou encore dans les cellules épithéliales différenciées (De Forges et al. 2012; Quinones et al. 2011).

Le comportement dynamique des microtubules peut donc résulter de l'instabilité dynamique (propriété intrinsèque des microtubules) mais aussi de l'interaction avec des protéines de régulation et de modifications post-traductionnelles. La dynamique des microtubules n'est pas équivalente dans toute la cellule. Certaines sous populations de microtubules peuvent être plus stables dans certaines régions, alors que d'autres seront plus dynamiques. Ces événements régulent par conséquent les forces (qu'elles soient de poussée ou de traction), agissant sur le positionnement du centrosome.

Forces de poussée et de traction

De nombreuses études expérimentales dites *in vitro*, c'est à dire réalisées dans des microsystèmes ou des chambres micro-fabriquées, s'affranchissent de la complexité cellulaire. Elles ont permis de compléter et de mieux appréhender le mode d'action et la contribution de chaque force dépendante des microtubules dans le centrage/décentrage du centrosome.

Concernant les forces de poussée, elles sont dépendantes de la répartition des points de contact entre les microtubules et le cortex, conséquence de la distribution des microtubules. Par ailleurs, la dynamique ainsi que la géométrie de la cellule ou de la chambre sont des paramètres à considérer dans le comportement des forces. Considérons par exemple une géométrie circulaire, des analyses théoriques tendent à montrer qu'une distribution isotrope des microtubules aura un effet de centrage du centrosome. En effet, les microtubules les plus courts et les plus proches de la périphérie génèrent plus de force et ainsi entraînent le centrosome vers la direction opposée (Figure 36 : schéma de gauche). A l'inverse, dans le cas d'une distribution des microtubules anisotrope, les microtubules les plus longs c'est à dire les plus éloignés du cortex du fait de leur accumulation, conduit à un décentrage du centrosome dans la direction opposée (Figure 36 : schéma de droite) (Pavin et al. 2012).



Distribution des microtubules isotrope Distribution des microtubules anisotrope

Figure 36 : Les forces de poussée exercées par les microtubules contre le cortex dans une chambre circulaire sont dépendantes de la distribution des microtubules.

A/ les microtubules sont distribués de façon homogène, les points de contact au cortex sont également répartis de façon homogène. Dans ce cas, les microtubules étant plus courts à gauche, ils exercent une tension de répulsion plus forte, déplaçant le centrosome du côté opposé (effet de centrage)

B/ les microtubules s'accumulent dans la région opposée au centrosome, influant sur la répartition des points de contacts au cortex. Ces points de contacts sont rapprochés dans cette même région créant une force qui déplace le centrosome vers la gauche (force de décentrage).

Schéma modifié à partir de Pavin et al. (2012).

Les études réalisées par Holy et collaborateurs ainsi que par Laan et collaborateurs ont permis de montrer la contribution des forces de traction et de poussée dépendantes des microtubules. Des centrosomes ont été purifiés à partir de cellules et placés dans des chambres micro-fabriquées carrées, leur permettant d'étudier le positionnement d'un aster en réponse à la géométrie. Dans le cas où les microtubules sont trop courts pour explorer tout l'espace de la chambre, l'aster de microtubule est totalement décentré (Figure 37 : schéma de gauche). En revanche, lorsqu'ils sont assez longs pour atteindre les bords de la chambre, ils peuvent, soit s'arrêter de pousser, soit se courber s'ils continuent de polymériser. Ces forces de compression poussent le centrosome vers le centre géométrique (Figure 37 : Schéma du centre) (Holy et al. 1997). La présence de dynéines au cortex améliore le centrage du centrosome. Dans ce cas, les dynéines ont capturé les microtubules au cortex contrôlant leur longueur. La balance des deux types de forces (traction et poussée) conduit l'aster au centre de la chambre (Figure 37 : Schéma de droite) (Laan et al. 2012).

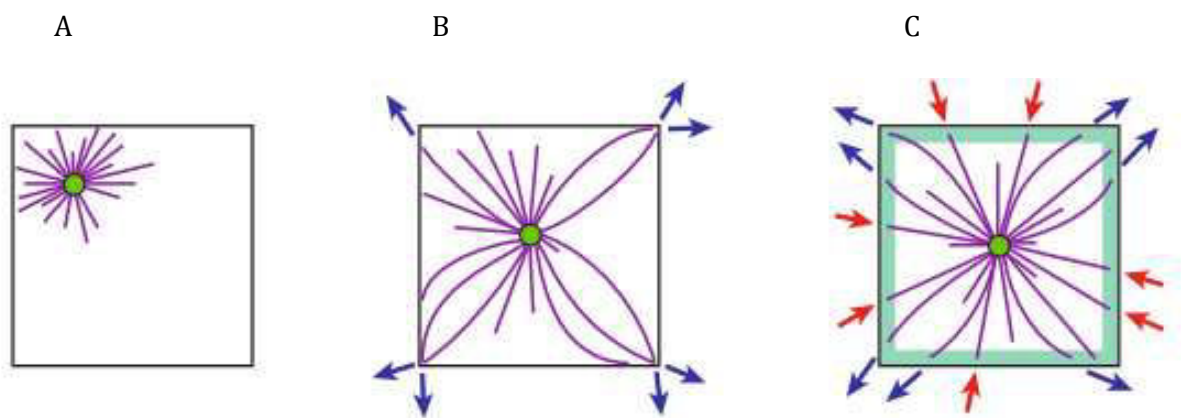


Figure 37 : Effet des forces de poussée et de traction sur le centrage de l'aster de microtubules. Adaptation des résultats de deux études réalisées par Holy et collaborateurs et Laan et collaborateurs (Laan et al. (2012); Holy et al. (1997)).

A/ l'aster est dans l'incapacité de se centrer étant donné la taille réduite des microtubules qui ne peuvent sonder les bords de la chambre

B/ les forces de poussée induites par la croissance des microtubules en atteignant les bords de la chambre recentrent l'aster

C/ La présence des dynéines corticales (carré vert) a un effet de traction sur les microtubules (flèches rouges). Cette force, supplémentée par les forces de poussée (flèches bleues) permet un centrage parfait de l'aster.

Figure extraite de Vignaud et al. (2012).

Dans ce cas, la distribution de la dynéine au cortex est homogène. Il est important de garder à l'esprit que pour une même géométrie, les forces de tractions peuvent être modifiées en cas de répartition asymétrique ou limitée des dynéines, ou en cas de présence de dynéines cytoplasmiques (Grill & Hyman 2005). Par ailleurs il existerait aussi des forces exercées par les kinésines sur les microtubules. Créant des forces opposées à celles de traction générées par les dynéines, elles sembleraient de faibles amplitudes.

Le confinement géométrique est aussi un paramètre important influant sur l'auto-organisation des microtubules. Pinot et collaborateurs étudient le comportement des asters de microtubules issus d'extrait cellulaires d'œufs de Xénope placés à l'intérieur de gouttelettes lipidiques de différentes tailles (Pinot et al. 2009). Celui-ci dépend du confinement spatial. En

effet, dans une gouttelette de grand volume (plus large que $29\ \mu\text{m}$), seuls quelques microtubules peuvent atteindre les bords et l'aster est donc stabilisé au centre géométrique. Dans des gouttelettes de diamètres oscillants entre 11 et $29\ \mu\text{m}$, les microtubules tendent à être plus longs que le rayon de la gouttelette. N'étant pas physiquement liés avec l'interface de la goutte, les microtubules forment des demi-asters décentrés créant une brisure de symétrie. Une diminution du volume de la gouttelette contraint d'autant plus les microtubules mécaniquement qu'ils n'ont pas d'autre choix que de glisser le long de la périphérie.

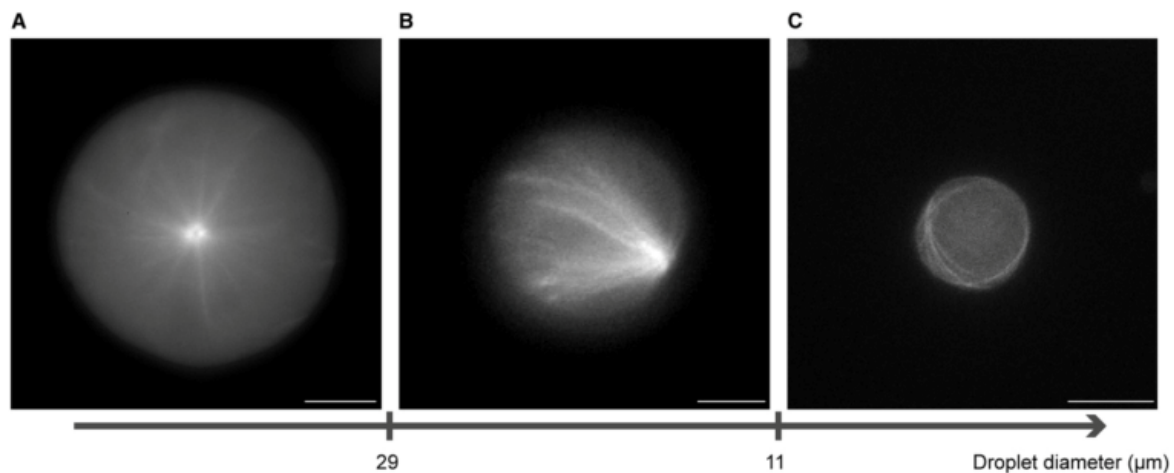


Figure 38 : Brisure de symétrie de l'organisation des microtubules induite par le confinement spatial

Echelle $10\ \mu\text{m}$

A/ Gouttelette dont le diamètre est supérieure à $29\ \mu\text{m}$: l'aster de microtubules est centré

B/ Gouttelette avec un diamètre entre 11 et $29\ \mu\text{m}$: formation d'un demi-aster décentré

C/ Gouttelette avec un diamètre inférieur à $11\ \mu\text{m}$: les microtubules glissent le long des bords de la gouttelette et s'alignent avec eux.

Figure extraite de Pinot et al. (2009).

b. Forces dépendantes de l'actine et de la myosine

Les filaments d'actine sont des polymères semi-flexibles capables de s'organiser en diverses structures, générant différents types d'architectures cellulaires comme le réseau branché dans le lamellipode, et des structures alignées dans les filopodes et les fibres contractiles (regroupant les fibres de stress ventrales et arcs transverses). Chaque architecture d'actine possède une fonction bien définie selon la localisation dans la cellule (Figure 39). Dans le cas d'une cellule en migration, le lamellipode se situe au niveau du front avant de la cellule. La polymérisation constante de nouveaux filaments d'actine en réseau branché, dictée entre autre par le complexe Arp2/3, y est active, poussant la membrane vers l'avant, formant des protrusions membranaires. Cette membrane génère en retour une résistance à la polymérisation. Sous la tension membranaire et s'associant avec des protéines de liaison à l'actine comme l'alpha-actinine et la myosine II (une protéine motrice des filaments d'actine), les filaments s'assemblent et s'alignent parallèlement au front avant, tout en se dirigeant vers l'intérieur de la cellule, en direction du noyau sous l'effet de la contraction. Ils subiront ensuite

une phase de désassemblage en arrivant dans la zone centrale où se trouve généralement le noyau. Ce phénomène est appelé flux rétrograde (Hotulainen & Lappalainen 2006). Il est maintenant bien établi que les filaments d'actine créent des contacts physiques avec les microtubules. Le flux des arcs transverses produit ainsi des forces mécaniques suffisantes pour promouvoir un mouvement centripète de certains microtubules associés aux filaments d'actine (Salmon et al. 2002). Ce phénomène est observé dans l'étude de Burakov et vient s'ajouter aux deux types de forces exercées par les microtubules détaillées précédemment, même s'il ne semble pas prédominant.

Avec les arcs transverses, les fibres de stress ventrales représentent la catégorie des fibres contractiles. Les fibres de stress sont reliées à chaque extrémité par les adhésions focales et décorées de myosines II. Elles sont dotées d'une capacité de mécanosensation via les adhésions avec le substrat et la maturation des adhésions (Blanchoin et al. 2014). Nous verrons par la suite que la contractilité des fibres de stress induite par la myosine II est probablement impliquée lors de la réorientation du centrosome dans certains contextes biologiques comme la formation de la synapse immunologique.

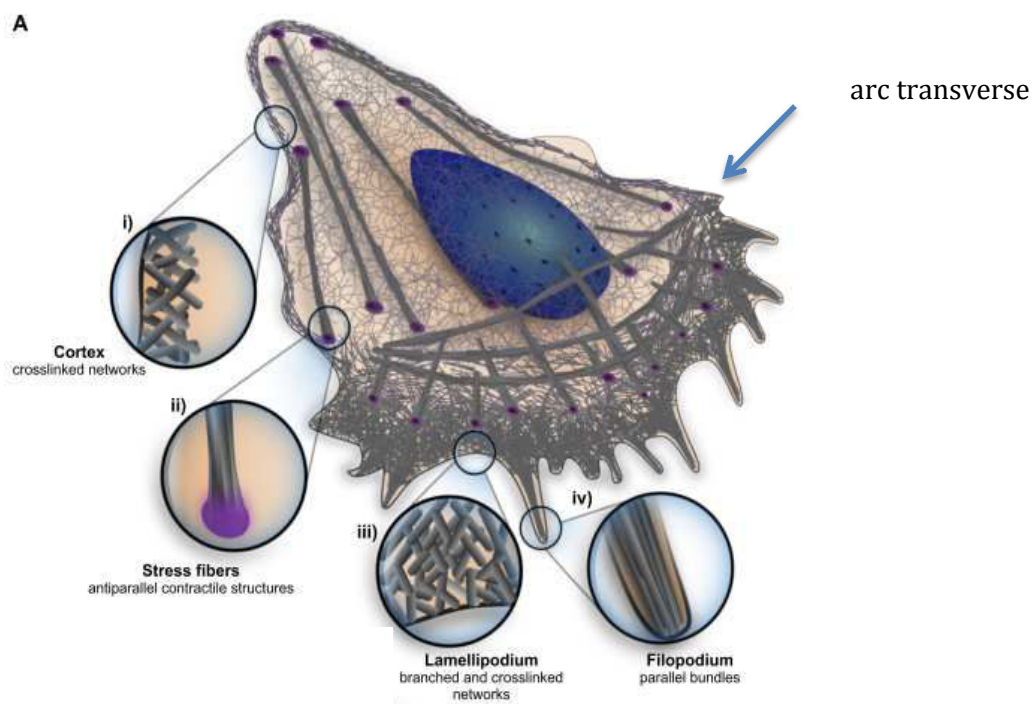


Figure 39 : Représentation des différents types d'assemblage des filaments d'actine dans la cellule
i/ le cortex cellulaire, fine couche de filaments d'actine, en contact avec la membrane cellulaire
ii/ fibre de stress contractile
iii/ le lamellipode structuré par un réseau branché et connecté de filaments d'actine
les arcs transverses prenant naissance sous le lamellipode
Figure extraite de Blanchoin et al. (2014).

Par ailleurs, p160ROCK, une protéine kinase dépendante de Rho et impliquée dans l'organisation de l'actine possède une localisation centrosomale. Elle a été identifiée pour son rôle dans le maintien de la position centrée du centriole père dans les cellules HeLa en interphase. L'inhibition de la contractilité induit un déséquilibre du positionnement du centrosome qui se promène alors le long de la membrane plasmique (Chevrier et al. 2002).

B. Signaux de polarité sous jacents au positionnement du centrosome

Comme vu précédemment, la polarité se définit par une brisure de symétrie, à la fois dans la forme de la cellule, l'organisation du cytosquelette, la distribution de constituants cellulaires et le trafic intracellulaire. Elle permet à la cellule d'acquérir une fonction spécifique. Des organismes unicellulaires aux métazoaires, la polarité est une caractéristique intrinsèque à chaque cellule. La diversité des formes cellulaires corrèle avec des fonctions cellulaires spécifiques: la forme allongée des neurones pour favoriser une communication sur de longues distances, les cellules jointives d'un épithélium pour former une barrière physique entre le milieu intérieur et extérieur etc. Malgré la variété de formes et de fonctions, certains mécanismes gouvernant la mise en place de la polarité sont communs (Nelson 2003). La polarité implique une organisation de domaines membranaires spécifiques et distincts : les domaines apico-basal d'une cellule épithéliale, le front avant et arrière d'une cellule en migration, la membrane apicale proche de la synapse immunologique etc.

Dans de nombreux cas, la cellule se polarise lorsque la membrane plasmique perçoit des changements en un point localisé. Les signaux de polarité concentrés alors à un endroit précis de la cellule entraînent une activation spatiale de voies de signalisation, conduisant à une réorganisation localisée du cortex et de l'ensemble du cytosquelette. La succession de ces événements permet la mise en place de forces asymétriques agissant sur les microtubules et contrôlant ainsi la position du centrosome au sein de la cellule. Dans cette partie, je vais m'attacher à décrire les principaux signaux de polarité mis en jeu lors de la polarité menant au décentrage du centrosome lors de la polarisation.

a. Le cortex cellulaire, les protéines ERM

Le cortex cellulaire représente le réseau de filaments d'actine s'accumulant sous la membrane plasmique. Il contient des protéines importantes pour la polarité : les protéines ERM (Ezrine Radixine Moésine). Elles interagissent avec des protéines transmembranaires dépendantes du type cellulaire (CD44, CD43 et quelques ICAM) ainsi qu'avec le cytosquelette d'actine pour organiser les domaines membranaires spécialisés comme les lamellipodes, les filopodes.

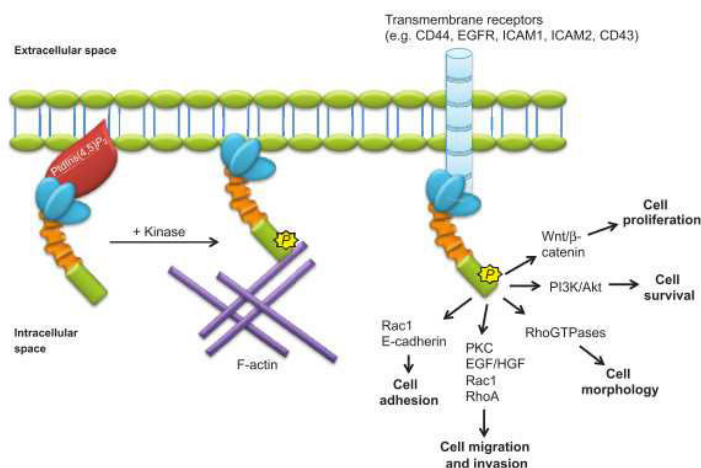


Figure 40 : Schéma illustrant l'activation des protéines ERM et la signalisation qui en découle.

Figure extraite de Clucas & Valderrama (2015).

Les protéines ERM sont recrutées et ancrées dans des régions riches en phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂) via leur domaine N terminal (en bleu sur le schéma de la figure 40). Le domaine C terminal (en vert sur le schéma de la figure 40) est sujet aux phosphorylations, déclenchant le dépliement de la protéine. Lorsque celle-ci possède une conformation active, elle est capable d'interagir avec les filaments d'actine pour réorganiser la structure de l'actine corticale.

La ségrégation de l'eitrine en un croissant cortical au stade 8 cellule du développement de l'embryon murin constitue une marque précoce de la polarité (Figure 41).



Figure 41 : L'eitrine est ségrégée au cortex hors de zones de contacts cellule/cellule au stade 8 cellules au cours du développement de l'embryon de souris (rouge : noyau, vert : ezrine) Figure extraite de Louvet et al. (1996).

Le rôle des ERM est largement attribué à leur capacité à lier les filaments d'actine à la membrane. Cependant, la moésine peut aussi lier directement les microtubules dans des conditions *in vitro* et les stabiliser au cortex dans des conditions *in vivo*. Cette association ERM/microtubules est par exemple importante pour réguler l'organisation du fuseau en métaphase (Solinet et al. 2013)

b. Les protéines PAR

Les protéines PAR (partitioning defective) sont des protéines corticales très étudiées étant donné leur implication dans la polarité. Elles ont été identifiées pour la première fois dans la cellule-œuf (ou zygote) de *C. elegans*. Puis elles ont été identifiées dans d'autres organismes multicellulaires. De manière générale, les protéines PAR contribuent à la régulation de la polarité pendant la division asymétrique, la morphogénèse épithéliale, le développement du système nerveux et la migration cellulaire (Tang & Marshall 2012). Leur caractéristique réside dans leur capacité à se concentrer spatialement, uniquement dans certaines régions du cortex, en réponse à des signaux. En effet, certaines protéines du complexe PAR - PAR3, PAR6 et aPKC (atypical protein kinase C) - sont réparties de manière asymétrique lors de la fertilisation du zygote de *C. elegans*, lors de la division des neuroblastes de drosophile, mais aussi dans les cellules épithéliales de mammifères. En effet, dans les MDCK cultivées en 3D, PAR3 est localisée aux jonctions serrées alors que aPKC et PAR6 se positionnent à la membrane apicale et dans le cytoplasme (Goldstein & Macara 2007). Elles agissent ainsi sur des cibles incluant des régulateurs du cytosquelette d'actine et de microtubules pour élaborer la polarité. Ce processus est dynamique, ce qui permet aux structures polarisées de s'adapter aux changements au sein de la cellule mais aussi à des changements environnementaux.

Le zygote de *C. elegans*, largement étudié lors de sa polarisation, représente un modèle de choix pour comprendre le rôle des protéines PAR et le rôle de leur asymétrie spatiale

(Goldstein & Macara 2007). Leur ségrégation crée des gradients indispensables à la mise en place de la division asymétrique et de la ségrégation inégale de déterminants pour le devenir de la cellule (Figure 42). Le centrosome apporté par le spermatozoïde lors de la fertilisation brise la symétrie de l'œuf, sa position spécifiant le pôle postérieur du zygote. Ce processus déclenche une asymétrie de la contractilité dépendante des myosines, causant une asymétrie de la localisation des protéines PAR. Plus précisément, le complexe PAR est exclu du pôle postérieur via le flux cortical et se trouve ainsi enrichi au pôle antérieur alors que PAR1 et PAR2 sont ségrégués spatialement au pôle postérieur. L'asymétrie mécanique causée par l'asymétrie de contraction du zygote est cruciale pour le maintien de la polarité biochimique et pour le positionnement du fuseau mitotique. Les deux cellules filles issues de cette première division asymétrique seront ainsi différentes en taille et en potentiel développemental. Elles permettront de produire les différents tissus de l'organisme (Nance & Zallen 2011).

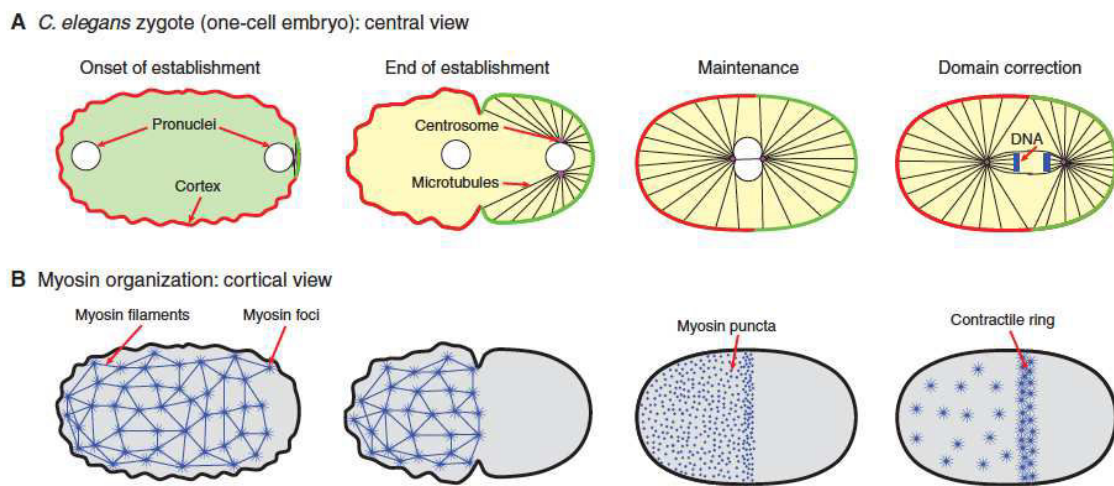


Figure 42 : Asymétrie de la localisation des protéines PAR et de la contractilité lors de la polarisation du zygote de *C. elegans*

A/ Lors de la fertilisation, PAR3 (ligne rouge) est répartie de façon homogène au cortex tandis que PAR1 et PAR2 se trouvent dans le cytoplasme. L'entrée du centrosome déclenche la formation de deux domaines: le cortex antérieur (à gauche du zygote) comportant le complexe PAR et le cortex postérieur contenant PAR1 et PAR2.

B/ Comportement de la myosine II (en bleu) aux mêmes stades que A. Les filaments d'actine décorés de myosines forment un réseau contractile au début de la phase de fertilisation. Puis celui-ci se contracte de façon asymétrique au pôle antérieur, et est inhibée au pôle postérieur. Le réseau de myosine se réarrange pour former des points de myosine répartis uniquement au niveau du pôle postérieur.

Figure extraite de Nance & Zallen (2011).

En plus d'interagir avec les microtubules, les protéines PAR pourraient générer la polarité avec l'aide du cytosquelette d'actine. Quelques exemples illustrent ce propos: le traitement des cellules épithéliales de drosophile avec un agent dépolymérisant les filaments d'actine empêche la localisation de Bazooka (homologue de PAR3) à la membrane apicale. Par ailleurs, chez les mammifères, PAR3 s'associe avec des régulateurs de l'actine (Nance & Zallen 2011).

c. Cdc42 au coeur de la polarité

La cellule sent son environnement et réagit en organisant sa propre polarité. Cette propension à répondre à différents stimuli est contrôlée principalement par une petite GTPase de la super famille Rho, Cdc42. L'activité de Cdc42 est régulée indirectement par l'activation de différentes familles de récepteurs présents à la surface cellulaire (intégrines, cadhérines, récepteurs aux facteurs de croissance etc.). Une fois activée, Cdc42 se lie à la membrane et stimule de nombreuses voies de signalisation modulant la réorganisation du cytosquelette d'actine et de microtubules, la mise en place du trafic membranaire et des contacts cellule/cellule (Etienne-Manneville 2004).

Cdc42 est impliquée dans l'établissement de la polarité dans des organismes variés, dans de nombreux types cellulaires et contextes cellulaires. Chez *C. elegans*, Cdc42 est enrichie au cortex antérieur juste après la fertilisation du zygote, au même titre que le complexe PAR. L'inhibition de Cdc42 révèle son rôle crucial lors de la mise en place de la polarité puisqu'elle empêche la localisation asymétrique du complexe PAR et cause une perte de polarité du zygote (Etienne-Manneville 2004). Il est probable que le trio Cdc42/PAR6/aPKC soit nécessaire pour le maintien de l'asymétrie du zygote.

Bien que le rôle de Cdc42 dans la polarité soit indéniable, la détermination de sa fonction précise chez les mammifères est difficile, car son activation requiert pléthore de régulateurs et active de nombreuses voies de signalisation. Elle est capable de moduler aussi bien le réseau de microtubules que le cytosquelette d'actine (Figure 43).

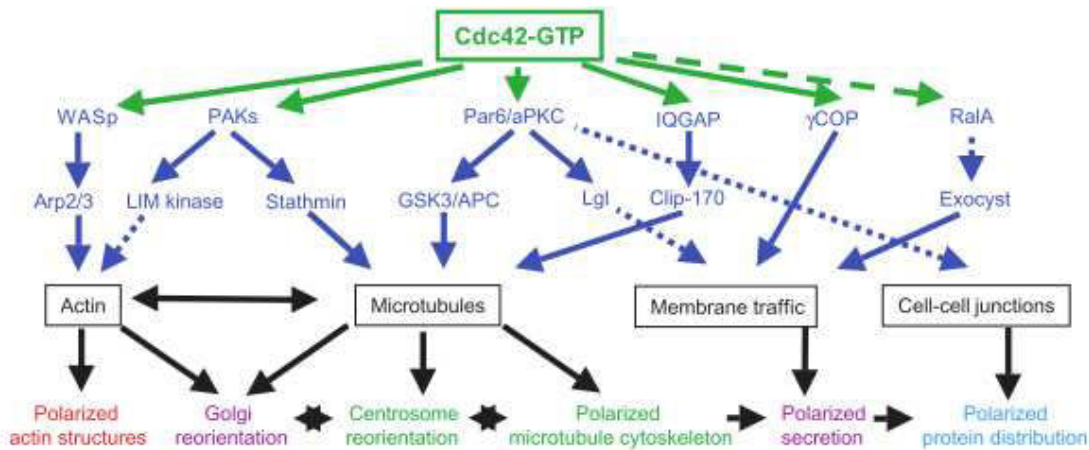


Figure 43 : Différentes voies de signalisation contrôlées par Cdc42. Les effecteurs de Cdc42 sont colorés en bleu (effet direct : ligne pleine, effet indirect : ligne en pointillé). Les composants cellulaires régulés par Cdc42 via les effecteurs sont encadrés dans un rectangle noir. Figure extraite de Etienne-Manneville (2004).

Nous verrons que Cdc42 joue également un rôle crucial dans la réorientation du centrosome que ce soit lors de la migration cellulaire des fibroblastes, des astrocytes, des cellules endothéliales, ou lors de la rencontre d'une cellule T avec une cellule présentatrice d'antigène ou encore lors de positionnement du fuseau chez *C. elegans* (Gundersen et al. 2004). Les voies de signalisation mises en jeu diffèrent, mais le chef d'orchestre reste le même.

d. *Cdc42, RhoA et Rac dans la formation des différents types de structures d'actine*

En plus de Cdc42, Rac et RhoA, deux autres petites GTPases appartenant à la famille des protéines Rho, sont impliquées dans le contrôle de la réorganisation de différentes architectures d'actine. Des expériences visant à injecter des formes activées de Cdc42, de Rac et de RhoA dans des fibroblastes de souris ont révélé les différents rôles joués par ces protéines (Figure 44). Cdc42 favorise la formation des filopodes. RhoA induit l'assemblage des fibres de stress à l'arrière de la cellule et régule la kinase Rho (ROCK) pour générer des filaments pourvus de myosine II, générant ainsi la contractilité cellulaire. Quant à Rac, il est plutôt dédié à la formation du lamellipode (Etienne-Manneville & Hall 2002; Akhshi et al. 2014). Ces différents types d'organisation d'actine provoquent ainsi des changements à la fois dans la tension corticale et les forces contractiles au sein de la cellule. La tension corticale est déterminante pour certains processus cellulaires comme la cytokinèse, la motilité et la morphogénèse des tissus. Dans le cas d'une cellule en migration, la tension corticale à l'arrière sera supérieure à celle du front avant.

L'activité de Cdc42, RhoA et Rac est spatialement restreinte, mais toutes sont interdépendantes. Des mécanismes augmentant l'activité d'une GTPase tend à diminuer l'autre (Akhshi et al. 2014). Tout ce système est très complexe car si Rac, Cdc42 et RhoA contrôlent aussi bien le réseau de microtubules que le cytosquelette d'actine, à l'inverse, une altération de la dynamique du cytosquelette peut affecter l'activité de ces RhoGTPases (Rodriguez et al. 2003).

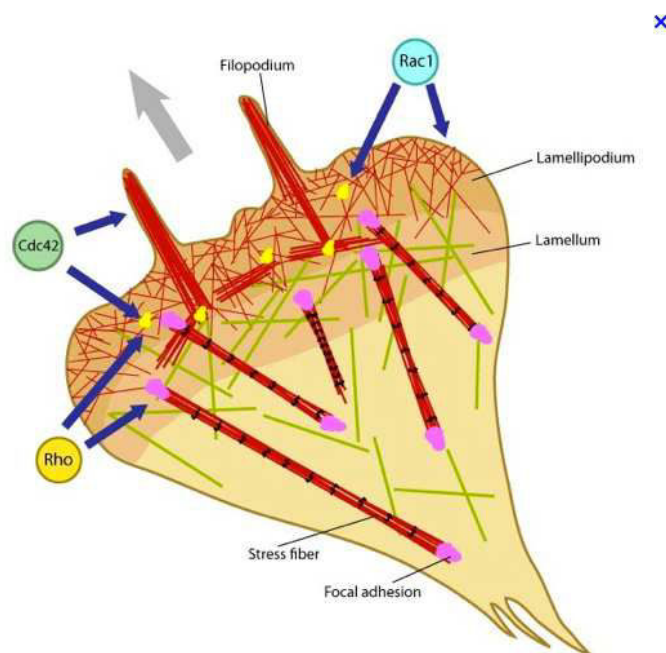


Figure 44 : Rôles des GTPases sur l'architecture de l'actine
Figure extraite du site <http://www.mechanobio.info/modules/>

e. Signaux extrinsèques

Les signaux extrinsèques provenant soit des contacts cellule/cellule, soit des contraintes spatiales imposées par le microenvironnement influent également sur l'ensemble du cytosquelette et par conséquent sur le positionnement du noyau et du centrosome. L'utilisation

des micro-patrons adhésifs recouverts de fibronectine permet de contraindre physiquement les cellules et d'étudier la réponse de la cellule à la distribution des adhésions (Figure 45). Le cytosquelette d'actine se comporte différemment selon s'il est situé sur les bords adhésifs ou non adhésifs. En effet, les filaments d'actine tendent à polymériser et former un réseau branché sur les cotés adhésifs, tandis qu'ils sont plus contractiles sur les côté non adhésifs. La dynamique et l'orientation de la croissance des microtubules agiraient en réponse à l'architecture de l'actine polarisée. L'axe noyau/centrosome est alors toujours orienté vers les zones adhésives (Théry et al. 2006).

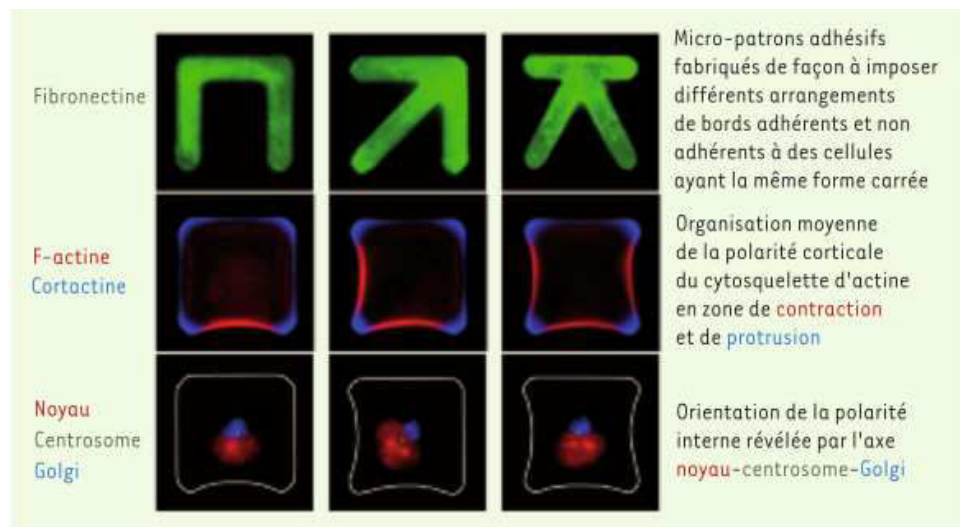


Figure 45 : La distribution des adhésions contrôle le positionnement du centrosome et du noyau.

En haut du panneau : Différentes formes de micro-patrons recouverts de fibronectine (en vert en haut du panneau) impose des contraintes spatiales aux cellules.

Au milieu du panneau : Indépendamment de la géométrie du patron, les cellules en s'étalant, prendront une forme carrée. Cependant, leur morphologie interne sera différente. Les cellules développent des fibres de stress, signe d'une tension élevée au niveau des zones non adhésives (en rouge, marquage des filaments d'actine au niveau des images au centre du panneau). En revanche, elles forment des protrusions membranaires au niveau des zones adhésives (révélée par la cortactine en bleu) révélant une tension plus faible.

En bas du panneau : les organelles sont positionnées en réponse à l'organisation de l'actine. Le centrosome reste centré quelque soit la configuration. Le noyau en revanche tend à se positionner vers les zones contractiles. L'axe noyau/centrosome s'oriente ainsi en réponse à l'asymétrie cellulaire.

Figure extraite de Théry & Bornens (2007).

C. Mécanismes impliqués dans les forces agissant sur la polarisation du centrosome

a. Principes généraux

De nombreux événements et voies de signalisation doivent agir de concert pour aboutir à la réorientation du centrosome laquelle est impliquée dans la polarité et la fonction cellulaire. Même si l'identité de certains acteurs peut différer selon le contexte et le type cellulaire, certains mécanismes restent similaires. Nous avons vu que la réorientation du centrosome implique la création de forces (poussée ou traction). A ma connaissance aucun cas de force de poussée exercée par les microtubules pour déplacer le centrosome n'a été identifié à ce jour. Ainsi ce sont

les forces de traction exercées par la dynéine localisée au cortex sur les microtubules qui prédominent.

Voici, quelques événements successifs importants pour la mise en place de cette force (la liste est non exhaustive et certains événements peuvent être interdépendants):

- **Activation des signaux de polarité** comme les RhoGTPases à une région spécifique du cortex, recrutement des effecteurs appropriés
- **Ségrégation de protéines corticales** à une région spécifique du cortex (PAR, ERM)
- **Changement de la dynamique et de l'organisation du cytosquelette d'actine.** La formation de foci au cortex sert de points d'ancrage aux microtubules qui, via la dynéine, exerceront une force de traction sur le centrosome.
- **Changement de la dynamique et de l'organisation de sous populations du réseau de microtubules.** De multiples acteurs interviennent dans ce processus: les RhoGTPases, APC grâce à leur interaction avec EB1 (Wen et al. 2004), la formine (mDia), les protéines PAR (Goldstein & Macara 2007), la moésine du complexe ERM (Solinet et al. 2013), la dynéine (Hendricks et al. 2012), ACF7 (Kodama et al. 2003).
- **Coordination structurale entre les cytosquelettes d'actine et de microtubules :** l'organisation des filaments d'actine en fagots peut servir de rails aux microtubules et ainsi guider l'orientation de leur croissance vers le cortex (Kodama et al. 2003). Par ailleurs, des protéines contribuent à la connexion des microtubules au cortex d'actine. C'est le cas de IQGAP1 (IQ motif-containing GTPase-activating protein), un effecteur de Cdc42/Rac, (Tamura & Draviam 2012), mais aussi de Dlg1, une protéine associée à la membrane et recrutant APC. La plectine (Rodriguez et al. 2003), la formine (Bartolini & Gundersen 2010), les ERM (Goode et al. 2000) sont d'autres connecteurs.
- **Capture des bouts « + » des microtubules au cortex.** Les forces de traction nécessitent l'action de protéines de liaison aux bouts « + » des microtubules localisées à des régions spécifiques du cortex (protéines + TIPs comme EB1). Celles-ci capturent les microtubules en régulant leur dynamique. où ils seront capturés et retenus. APC, ACF7 (Kodama et al. 2003) sont d'autres candidats.
- **Recrutement et ancrage cortical de la dynéine:** une fois au cortex, les bouts « + » des microtubules pourront se lier au cortex directement avec le complexe dynéine/dynactine (générateur de force) préalablement recrutée ou via des connecteurs corticaux en lien avec la dynéine: NuMA, LGN (leucine-Glycine-asparagine repeat protein), Lis1 (Tamura & Draviam 2012), EB1, ou encore Clip170 (Manneville & Etienne-Manneville 2006)

Les microtubules associés à la dynéine peuvent générer des forces directement sur le centrosome. La contractilité des filaments d'actine peut aussi contribuer au mouvement du centrosome afin de rendre plus efficace le repositionnement lors de la polarisation.

Afin que mieux appréhender la succession des événements menant au repositionnement du centrosome, je vais décrire succinctement les voies de signalisation ainsi que le type de force impliqués dans les trois processus biologiques déjà évoqués.

b. Cas de la mitose

Le mécanisme de force de traction exercée par la dynéine au cortex est commun à toutes les divisions de *C. elegans*, en passant par la levure jusqu'aux mammifères. Je vais détailler ici la première division du zygote de *C. elegans*, car les mécanismes impliqués dans le positionnement

du fuseau ont été très largement détaillés. Avant la première division du zygote, les PAR sont localisées asymétriquement au cortex ; PAR3, PAR6 et aPKC au cortex antérieur et PAR1, PAR2 au cortex postérieur. Lors de la première division, la traction corticale se trouve être elle aussi inégale puisqu'elle est supérieure au pôle postérieur comparée à celle du pôle antérieur, expliquant le positionnement du fuseau vers le cortex postérieur. Dans ce modèle, la **force de traction générée par la dynéine ancrée au cortex est couplée à un phénomène de dépolymérisation des microtubules atteignant le cortex** (« microtubule end on capture shrinkage ») (Nguyen-Ngoc et al. 2007). Ce phénomène de traction corticale des microtubules serait contrôlé par certaines protéines PAR notamment (Goldstein & Macara 2007). En effet, des mutants PAR, incapables de générer une polarité antéro-postérieure, se divisent de façon symétrique (Akhshi et al. 2014). Les PAR seraient donc impliquées dans le phénomène de décentrage du fuseau vers le cortex postérieur mais de quelle façon ?

Il a été démontré que la dynamique des microtubules au cortex postérieur est accrue comparativement au cortex antérieur. PAR3 serait mis en jeu car il stabiliserait de manière indirecte les microtubules atteignant le cortex (Labbé et al. 2003). De plus, les protéines PAR serviraient de médiateurs entre le cortex et les moteurs des microtubules. En effet, elles permettent le lien entre les sous-unités α des protéines G et LIN5 (NuMA chez les mammifères). LIN5 associe les microtubules et la dynéine, quant aux sous-unités α des protéines G, elles sont impliquées dans les forces de tractions corticales (Figure 46). Même si les mutants ne présentent pas de défaut de polarisation des protéines PAR au cortex, les forces agissant sur les microtubules aux deux pôles sont identiques (Gönczy 2015; Akhshi et al. 2014). Les sous-unités alpha des protéines G pourraient ainsi interférer via les protéines PAR avec le positionnement du fuseau via leur effet sur la dynamique des microtubules.

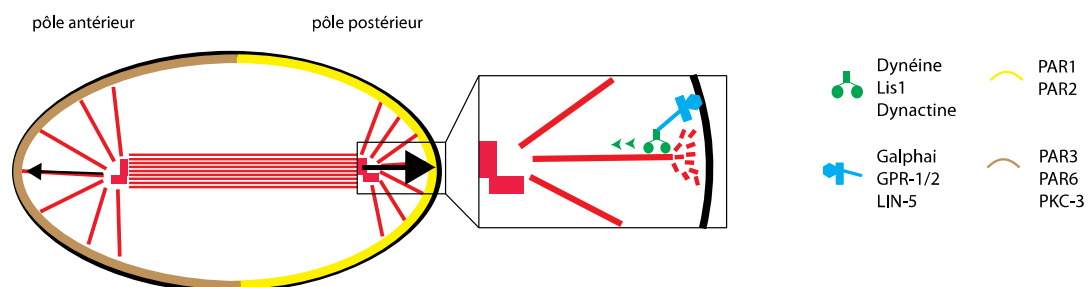


Figure 46 : L'interaction cortex/microtubules astraux permet de positionner de manière asymétrique le fuseau mitotique dans l'embryon de *C. elegans*. L'épaisseur des flèches noires reflète la puissance des forces exercées par la dynéine depuis le cortex sur les microtubules. La force est supérieure au pôle postérieur. Figure basée sur Siller & Doe (2009).

Lors de l'entrée en mitose, la cellule s'arrondit mais reste toujours en contact avec les adhésions focales de la matrice extracellulaire par le biais de fibres de rétraction riches en actine. Il a été découvert que le positionnement du fuseau dépend d'un dialogue entre les microtubules astraux et le cytosquelette d'actine cortical relié à ces fibres. En effet, l'absence de cette communication engendre une orientation du fuseau aléatoire (Maier et al. 2013).

Les protéines ERM, par le biais de la réorganisation du cortex et du recrutement localisé de protéines nécessaires aux forces de traction (NuMA, LGN), jouent aussi un rôle essentiel dans

l'orientation du fuseau mitotique (Théry et al. 2005; Machicoane et al. 2014). Par ailleurs, merline (NF2), un autre membre des protéines ERM contrôle et restreint la localisation de l'eitrine au cortex des cellules épithéliales colorectales capables de former des structures en acinus. A son tour, l'eitrine corticale régule la position du centrosome via les microtubules astraux. En absence de merline, la localisation de l'eitrine n'est plus apicale et les fuseaux mitotiques mal orientés (Hebert et al. 2012).

c. Cas de la migration

La position du centrosome par rapport au noyau peut varier d'un type cellulaire à l'autre. En règle général, l'axe noyau/centrosome est parallèle au front arrière/avant. Alors que la position du centrosome peut être en continu ajustée afin que ce dernier reste localisé entre le noyau et le front avant (cas des astrocytes et des neurones), elle peut être également maintenue centrée dans le cas des NIH3T3 stimulées au LPA (acide lysophosphatidique). Dans ce contexte, c'est alors le noyau qui se déplace vers l'arrière de la cellule (Gomes et al. 2005). Cela implique l'existence de différents mécanismes mis en jeu lors de la polarisation du centrosome selon les types cellulaires. Dans tous les cas, l'intégrité des microtubules est cruciale puisqu'une dépolymérisation des microtubules induite par addition de nocodazole est à l'origine d'un défaut de positionnement du centrosome, processus qui se rétablit après lavage. Le réseau de microtubule est hautement polarisé pendant la migration. Il se caractérise par un enrichissement de microtubules stabilisés (détyronisation ou acétylation principalement) au front avant (De Forges et al. 2012). En plus de la stabilisation des microtubules, l'activation de RhoGTPases, ainsi que l'ancrage des microtubules par la dynéine au front avant sont des dénominateurs communs au positionnement du centrosome dans les cellules en migration. **Une force de traction est appliquée par la dynéine** au front avant afin de maintenir ou déplacer le centrosome vers l'avant (Figure 47) (Barker et al. 2015).

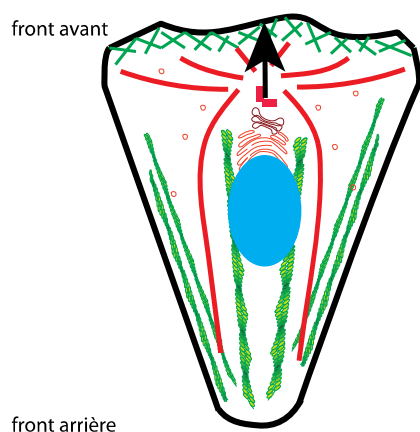


Figure 47 : Dans le cas de migration d'un astrocyte, la dynéine recrutée au front avant génère une force de traction et repositionne le centrosome vers cette région (force indiquée par la flèche noire). Dans le cas des fibroblastes stimulés au LPA, le centrosome est maintenu en position centrée grâce à la dynéine également.

Cdc42 est le principal régulateur du positionnement du centrosome pendant la migration. Dans le cas de test de blessure des astrocytes et des fibroblastes, Cdc42 est localement stimulée suite à l'activation des intégrines au front avant (Tang & Marshall 2012). Elle agit principalement via le complexe Par6/aPKC ζ , son inhibition dans ces cellules induit une orientation aléatoire du centrosome (Etienne-Manneville & Hall 2002). Dans le cas des astrocytes, le complexe Par6/PKC ζ permet de recruter APC aux bouts « + » des microtubules.

Grâce à son association avec APC, Dlg1 associée à la membrane permet de polariser et d'ancrer les microtubules au front avant des astrocytes. La dynéine, à son tour activée, repositionne le centrosome en direction de la migration via sa fonction d'ancrage cortical et de traction sur les microtubules (Etienne-Manneville 2005).

L'étude de la polarisation lors de la migration des fibroblastes NIH3T3 soumis au test de blessure puis stimulés avec le LPA démontre le rôle de RhoA dans la dynamique des microtubules et dans le positionnement du centrosome. Le LPA est connu pour activer RhoA et la formation de fibres de stress. Lors du test de blessure des NIH3T3 traités avec le LPA, la stimulation localisée de RhoA est à l'origine de la formation de microtubules stables détyrosinés à l'avant de la cellule. La formine mDia, régulatrice de l'assemblage des filaments d'actine, serait impliquée dans ce processus de stabilisation des microtubules. Elle a été identifiée comme étant un des effecteurs de RhoA. Ainsi, en s'associant avec EB1 et APC aux extrémités « + » microtubules, elle forme un complexe cortical capturant et stabilisant leur dynamique (Wen et al. 2004). D'autre part, la stabilité des microtubules pourrait être promue par l'activation des intégrines et des FAK (focal adhesion kinase), lesquelles coordonneraient de manière spatio-temporelle la formation de microtubules détyrosinés (Figure 48) (Wojnacki et al. 2014).

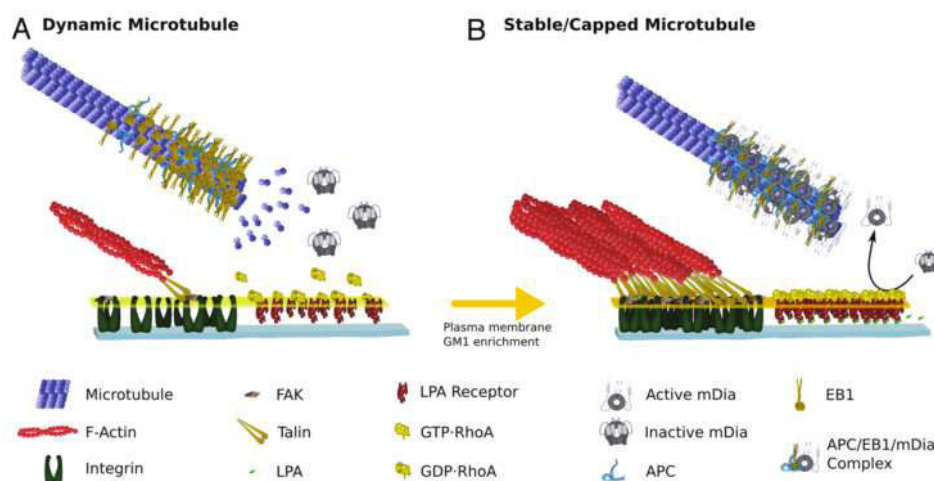


Figure 48: Exemple de modification de la stabilité des microtubules pouvant se produire au front avant de fibroblastes en migration et ayant subi un test de blessure, et traités au LPA (lysophosphatidic acid connue pour activer RhoA et la formation de fibres de stress)

A/ En absence de LPA, les microtubules sont dynamiques. Leurs bouts « + » sont associés aux protéines EB1 et APC. RhoA a une conformation inactive (GDP-RhoA), de même pour mDia. Les adhésions focales sont peu nombreuses à la membrane.

B/ La stimulation des fibroblastes par le LPA induit une activation des intégrines et des voies de signalisation associées, conduisant à l'assemblage et la maturation des adhésions focales à la membrane. Parallèlement, l'activation de RhoA est couplée à formation de microtubules détyrosinés. Figure extraite de Wojnacki et al. (2014).

Lors de la stimulation des fibroblastes NIH3T3 avec le LPA, le noyau se déplace activement vers l'arrière de la cellule tandis que le centrosome reste centré. Il s'avère que les mécanismes de centrage du centrosome sont indépendants du positionnement du noyau Deux

voies principales bien distinctes contrôlent chacun de ces événements. Le mouvement du noyau est déclenché par l'activation de Cdc42. Cdc42 active la kinase MRCK (Myotonic related Cdc42-binding kinase), qui en retour stimule la phosphorylation de la myosine II permettant un flux rétrograde d'actine effectif (Gomes et al. 2005). Couplé physiquement aux câbles d'actine via les TAN lines (transmembrane actin-associated nuclear) composées de nesprine 2G et de SUN2, le noyau est déplacé par le flux rétrograde, se dirigeant vers l'arrière de la cellule (Luxton et al. 2010; Luxton et al. 2011). La dynéine et le complexe PAR6/aPKC ζ ne sont pas impliqués dans le mouvement du noyau mais sont requis pour le maintien de la position centrée du centrosome (Barker et al. 2015).

d. Cas de la formation de la synapse immunologique

La réorientation du centrosome lors de la polarisation de la cellule T est remarquable en terme de trajectoire et de rapidité. Lorsque la cellule rencontre une cellule cible présentant un antigène, le centrosome est transporté du front arrière de la cellule jusqu'à la synapse immunologique nouvellement formée et localisée au front avant, cela en quelques minutes seulement. Contrairement aux cellules en migration, le centrosome s'oriente indépendamment du noyau.

Une technique utilisant des pinces optiques a permis de contrôler la mise en contact de la cellule T avec la cellule présentatrice d'antigène et d'imager la formation des synapses sur cellules vivantes. Le suivi en direct du repositionnement du centrosome a permis de dévoiler la force agissant sur le centrosome. A l'instar de la première mitose de l'embryon de *C. elegans*, la réorientation du centrosome est animée par la **capture des microtubules par la dynéine couplée à leur dépolymérisation** (Yi et al. 2013). Bien qu'il soit clair que la polarisation du centrosome est dépendante de la dynéine, une récente étude révèle le **rôle additionnel de la myosine II** dans la réorientation du centrosome (Figure 49).

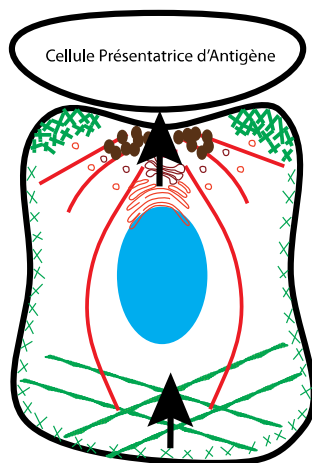


Figure 49 : La réorientation du centrosome suite à la rencontre d'une cellule T avec une cellule cible, est conduite par une force de traction. Celle-ci est exercée par la dynéine ancrée au niveau de la synapse sur les microtubules, lesquels dans le même temps subissent un processus de dépolymérisation. Une force de poussée induite par la contractilité des filaments d'actine localisés à l'opposé de la synapse contribue également à la translocation du centrosome.

En effet, l'inhibition de la dynéine réduit modérément la réorientation du centrosome, indiquant la coexistence de plusieurs mécanismes. La combinaison de l'inhibition de la dynéine avec l'inhibition de la myosine II (blebbistatine), provoque un effet plus marqué révélant le rôle de la myosine II dans le positionnement du centrosome. Leur rôle diffère puisque leur localisation est distincte. La myosine II phosphorylée s'accumule à l'arrière de la cellule et la

dynéine, au niveau de la synapse (Liu et al. 2013). Le rôle de la myosine II est encore mystérieux. Elle aurait certainement un rôle de force de poussée sur le centrosome.

Par ailleurs, l'eitrine et Dlg1 sont enrichies à la synapse immunologique et jouent un rôle déterminant dans la polarisation de la cellule T. L'organisation des microtubules des cellules déplétées en eitrine ou en Dlg1 est affectée et le centrosome mal orienté. Dlg1 ancré au cortex au niveau de la synapse, via une interaction avec l'eitrine connecte les microtubules à la périphérie de la synapse ce qui conditionne la polarisation du centrosome (Lasserre et al. 2010).

Qu'en est-il de la dynamique des microtubules, une caractéristique commune à beaucoup de processus de polarisation ?

Il s'avère que les modifications post-traductionnelles des microtubules est une étape importante pour la polarisation du centrosome. L'exemple le plus marquant est celui de la déacétylase HDAC6. Lors de la stimulation des cellules T, elle est redistribuée et se trouve enrichie à la synapse naissante. Elle module le niveau d'acétylation des microtubules de cette région afin d'assurer une formation, une maturation et une maintenance correctes de la synapse (Serrador et al. 2004). Le défaut de réorientation du centrosome causé par la surexpression de HDAC6, peut être contré par l'inhibition de HDAC6 (Ritter et al. 2013).

Plusieurs protéines de liaison à l'actine participent à la réorientation du centrosome dont les formines (mDia FLMN1 formin like 1 et INF2). Leur rôle est indépendant de la réorganisation de l'actine, en revanche il est dépendant de leur action sur la stabilité des microtubules. Ces formines via la détyronisation et l'acétylation des microtubules, forment un réseau de microtubules stables à proximité du centrosome. Ces modifications pourraient générer des forces de traction, lesquelles conduisent et dirigent le centrosome vers la synapse. (Stinchcombe & Griffiths 2014).

A travers ces exemples, il est clair que les forces de traction exercées sur les microtubules pour positionner le centrosome sont majoritaires et prédominantes. Cependant, le rôle de la myosine n'est pas à ignorer, que ce soit via le flux rétrograde dans les cellules en migration, ou via la force de poussée dans les cellules T. Par ailleurs, il a été rapporté que la contraction des filaments d'actine induite par la myosine II intervient aussi dans le déplacement du centrosome lors de la migration des neurones (Solecki et al. 2009).

PROBLEMATIQUE

I. Modification de l'organisation et de la dynamique du cytosquelette lors de la polarisation d'une cellule épithéliale

Certains types de cellules épithéliales représentent un modèle de choix pour étudier la formation du cil *in vitro*, en particulier les cellules rénales et les cellules de rétine. De morphologies différentes (cubique, cylindriques ou pavimenteuses), une des propriétés des cellules épithéliales repose sur leur capacité à interagir d'une part avec des cellules avoisinantes, et d'autre part, avec la matrice extracellulaire via les intégrines notamment. Hautement polarisées, les cellules épithéliales possèdent deux domaines membranaires structurellement et fonctionnellement distincts mais physiquement connectés : le pôle apical et le pôle basal. Ces deux pôles opposés définissent un axe de polarité : l'axe apico-basal. Ces deux pôles permettent de former une barrière de perméabilité et d'échanges entre l'organe et le reste de l'organisme. Le pôle apical est tourné vers la lumière de la cavité de l'organe, tandis que la surface basale repose sur la lame basale constituée d'une matrice extracellulaire permettant de séparer les cellules épithéliales du tissu conjonctif (Figure 50).

La différenciation d'une cellule épithéliale est initiée par des interactions cellule/matrice extracellulaire et cellule/cellule. Cela conduit à la mise en place d'une asymétrie biochimique comme en témoigne la ségrégation de composants moléculaires aux différents domaines de la cellule (sites d'adhésion, domaines membranaires etc.). Il a été démontré à titre d'exemple que durant la cystogénèse des cellules rénales MDCK, Cdc42 est activé et recruté à la membrane apicale. Il se lie alors au complexe Par6/aPKC afin de permettre le développement de la membrane apicale. Par3 serait quand à lui associé au niveau de jonctions cellule/cellule (Martin-Belmonte et al. 2007).

La cellule épithéliale polarisée se caractérise par la perte de l'organisation radiale des microtubules et par la présence de microtubules non centrosomaux organisés en fagots longitudinaux et parallèles à la membrane apico-basale. Les extrémités « - » sont orientés vers la membrane apicale et les bouts « + » vers la membrane basale, conférant à la cellule une asymétrie cellulaire (Müsch 2004; Moss et al. 2007). En association étroite avec l'appareil de Golgi, la réorganisation du réseau de microtubules va de pair avec la polarisation de la machinerie du trafic vésiculaire. Une structure spécifique des filaments d'actine est présente à la membrane apicale.

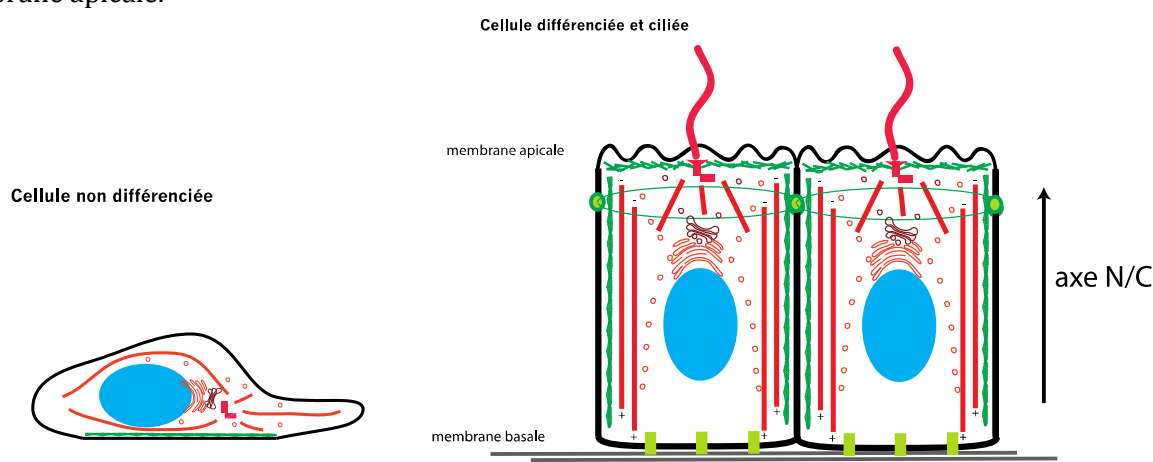


Figure 50 : Réorganisation du cytosquelette lors de la différenciation d'une cellule épithéliale. En haut : cellule épithéliale non différenciée. En bas : cellules épithéliale différenciée. (Vues de côté)

Contrairement aux processus biologiques précédemment décrits, les voies de signalisation et les forces impliquées dans la réorientation du centrosome lors de la ciliogénèse d'une cellule épithéliale restent encore mal comprises. Cependant, il est à présent établi que le remodelage du cytosquelette d'actine est impliqué dans la ciliogénèse. En effet, elle est requise à l'ancrage du centrosome (ou corps basal) à la membrane apicale. Par ailleurs, quelques éléments tendent à suggérer que le changement de dynamique des microtubules pourrait participer au mouvement du centrosome lors de la ciliogénèse. Comment le cytosquelette se réorganise-t-il au cours de la ciliogénèse ? Quels sont les acteurs impliqués ? Des données de la littérature commencent à apporter des éléments d'information, cependant, ils demeurent encore parcellaires. Ils sont exposés dans la partie suivante.

II. Le cytosquelette d'actine est impliqué dans la migration du centrosome lors de la ciliogénèse

L'intervention du cytosquelette d'actine dans le processus de migration du corps basal et dans la ciliogénèse est beaucoup plus évidente dans le cas de la multiciliogénèse que de la ciliogénèse (celle menant à la formation du cil primaire). Alors que la multiciliogénèse nécessite l'intégrité du cytosquelette d'actine, la ciliogénèse requiert également une régulation fine des différentes architectures d'actine.

1. Cas de la multiciliogénèse

La multiciliogénèse se caractérise par la formation de multiples centrioles *de novo* dans le cytoplasme. Ceux-ci vont ensuite migrer, se différencier en corps basaux et s'ancrer dans le réseau apical d'actine pour ensuite former des cils motiles.

Les premières expériences datant de plus de 25 ans, révèlent que le mouvement des centrioles à la membrane apicale nécessite un cytosquelette d'actine intègre et implique des interactions actine/myosine. En effet le traitement des oviductes de cailles avec la cytochalasine D (un agent dépolymérisant les filaments d'actine) est sans ambiguïté : il empêche le transport des centrioles à la surface apicale (Lemullois et al. 1988; Boisvieux-Ulrich et al. 1989; Boisvieux-Ulrich et al. 1990).

Outre sa régulation de l'expression des gènes impliqués dans la motilité ciliaire, FoxJ1 contrôle aussi, de part son action sur l'organisation du cytosquelette d'actine, le mouvement et l'ancrage apical du corps basal. En effet FoxJ1 possède différentes cibles lui permettant de réguler l'activité de RhoA, l'ezrine, et ERK7 notamment, toutes les trois impliquées dans la régulation de la multiciliogénèse. Pan et collaborateurs démontrent en 2007 que l'activation de RhoA dans les cellules multiciliées murines de trachées est déterminante pour l'enrichissement d'un réseau spécifique d'actine à la membrane apicale. Par conséquent, l'ancrage des corps basaux y est favorisé (Pan et al. 2007). L'ezrine fait le lien entre les corps basaux et les filaments d'actine du réseau cortical. Son inhibition dans les oeufs de Xénope altère la structure de l'actine apicale, laquelle devient plus fine et empêche la migration des corps basaux (Epting et al. 2015). Quant à la kinase ERK7 (Extracellular signal Regulated Kinase), elle phosphoryle un régulateur de formation de réseaux d'actine CapZIP (Miyatake et al. 2015).

Certains micro-ARNs (miARNs) peuvent intervenir lors de la ciliogénèse. C'est le cas du miR-34/449 qui se trouve enrichi dans les organes contenant de multiples cils motiles. L'absence de ce micro-ARN dans les souris induit un défaut d'ancrage des corps basaux pouvant

s'apparenter à un défaut de migration. Chevalier et collaborateurs ont montré dans l'épiderme de Xénope que l'ancrage des corps basaux était déterminé par l'effet positif du miR-34/449 sur la formation du réseau apical d'actine via la redistribution de la filamine A au cortex et l'augmentation de l'activité de RhoA (Chevalier et al. 2015).

De façon intéressante, Antoniades et collaborateurs ont identifié la localisation de protéines d'adhésions focales (FAK, paxilline, vinculine et taline) aux futurs corps basaux. Ces adhésions focales connectent ainsi les corps basaux avec les filaments d'actine et sont présentes pendant leur transport jusqu'à la membrane apicale. Ce lien est fonctionnel puisque l'inhibition de FAK (régulateur critique des adhésions focales) cause un défaut de migration des corps basaux. Cette perte de lien entre les corps basaux et le cytosquelette entraîne un défaut de ciliogénèse (Antoniades et al. 2014). Aussi présents au niveau du corps basal du cil primaire, aucune conséquence sur la migration n'a encore été identifiée dans ce contexte.

2. Cas de la formation du cil primaire

A. Facteurs régulant un changement d'organisation de l'actine lors de la ciliogénèse

Le crible génomique fonctionnel réalisé par Kim et collaborateurs sur les cellules hTERT-RPE1 a révélé que l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine sont aussi cruciales pour la formation du cil primaire. De nombreux modulateurs négatifs et positifs impliqués dans le processus ciliogénique mais aussi dans la longueur du cil sont identifiés à l'issue de ce crible. Cela révèle que les mécanismes semblent plus complexes que dans le cas de la multiciliogénèse car ils nécessitent des régulateurs de l'actine. A titre d'exemple, la formation de l'actine filamenteuse (actine F) branchée présente au niveau du lamellipode régule négativement la ciliogénèse. En effet, l'inhibition de la sous unité du complexe ARP2/3, responsable de la nucléation du réseau branché dans les cellules non sevrées, induit un nombre élevé de cellules ciliées, et dans les cellules sevrées une augmentation significative de la taille des cils (Kim et al. 2010). Les travaux de Cao montrent par ailleurs que la surexpression du miR-129 (micro ARN-129) inhibe également quatre régulateurs de l'actine F. ARP2 et TOCA1, sont une sous-unité et un co-activateur du complexe ARP2/3 respectivement ainsi que des protéines de liaison responsables de la formation du lamellipode (ABLIM1, ABLIM2). En condition de sevrage, l'absence de ces quatre protéines augmente la longueur des cils (Cao et al. 2012). L'importance de l'organisation du cytosquelette d'actine a été mise en lumière lors du traitement des cellules hTERT-RPE1 avec des petites doses de cytochalasine D. Elle accélère le délai de formation du cil ainsi que la taille du cil. Le cil se forme 2h après la privation de sérum, avec un cil deux fois plus grand que dans les cellules contrôles où le cil se forme 12h après le sevrage. A l'inverse, l'inhibition de la gelsoline responsable de la dislocation des filaments d'actine inhibe la ciliogénèse, la classant comme un modulateurs positif de la ciliogénèse (Kim et al. 2010).

Quel est le rôle du cytosquelette d'actine sur la ciliogénèse ?

Son rôle reste encore mystérieux mais il semble maintenant évident qu'il influence le trafic de vésicules. Dans le chapitre 2, nous avons vu que le trafic de vésicules est omniprésent et crucial dès le début de la ciliogénèse. L'inhibition de l'actine F, induite par la privation de sérum, pourrait favoriser et orienter ce trafic de vésicules ciliogéniques positives pour Rab8 et Rab11 vers la base du cil. L'observation d'une accumulation de vésicules positives pour Rab11 au niveau du centrosome dans les cellules traitées à la cytochalasine D, les cellules déficientes en

ARP3 ou encore surexprimant mir-129 semblent confirmer cette hypothèse (Yan & Zhu 2013). La présence de la structure transitoire péracentriolaire PPC (pericentrosomal preciliary compartment) favorisée par ce trafic serait un site d'ancrage de ces vésicules fonctionnant comme un réservoir temporaire de lipides et de protéines membranaires nécessaire à la ciliogénèse. Certaines protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine et modulant négativement la ciliogénèse pourraient agir en déstabilisant ce réservoir et inversement, l'augmentation de la longueur du cil consécutive à la déstabilisation de l'actine pourrait résulter d'un trafic accru de membranes jusqu'au corps basal.

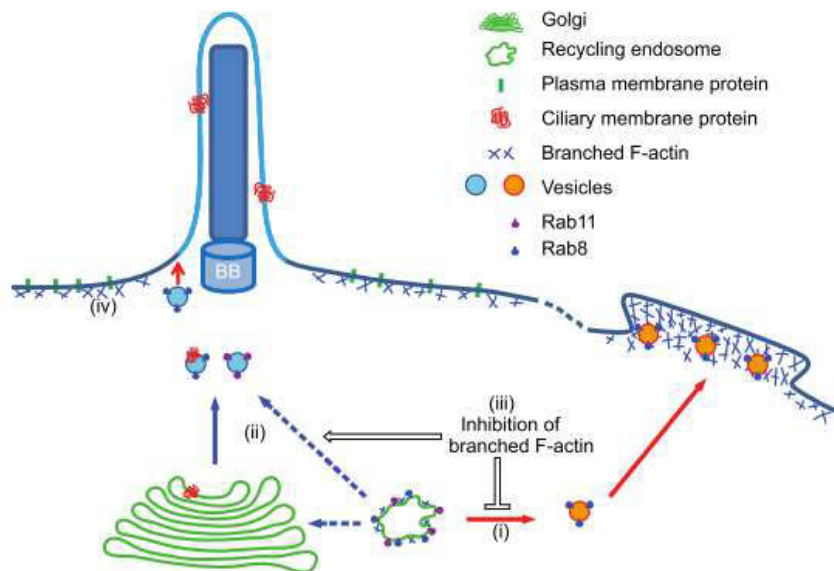


Figure 51 : Modèle illustrant le rôle inhibiteur de l'actine branchée lors de la ciliogénèse. Figure extraite de Yan & Zhu (2013).

Si la présence d'un réseau branché d'actine inhibe la ciliogénèse ainsi que la taille des cils, il en est de même lorsque l'activation de RhoA est trop élevée. En effet, l'activité de RhoA est augmentée dans les cellules rénales provenant des souris déficientes pour *bbs4*, une protéine appartenant au BBSome. L'activité de RhoA sur stimulée est associée à une diminution du nombre de cellules ciliées, une réduction de la taille des cils et la présence de fibres de stress à la membrane apicale. L'inhibition de RhoA dans les cellules *bbs4* $-/-$ restaure à la fois la taille du cil, la proportion de cellules ciliées ainsi que l'intégrité de l'actine à la membrane apicale (Hernandez-Hernandez et al. 2013).

B. Facteurs régulant la migration du corps basal durant la migration du corps basal dans les cellules ciliées

Il est à présent bien établi que certains régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine contrôlent la ciliogénèse. L'étape concernant la migration du corps basal au cortex nous intéresse particulièrement car les mécanismes sous-jacents à ce processus restent parcellaires. Ce manque de données s'explique notamment par des raisons techniques. Les cellules (primaires ou lignées) cultivées dans des flacons de culture sont étalées et relativement plates. Cela rend la mesure du positionnement du corps basal en z difficile et par conséquent l'étude de sa migration délicate.

Quels sont les régulateurs connus de la migration du corps basal lors de la ciliogénèse ?

L'équipe de Johnson a identifiée le rôle de la protéine meckeline et deux de ses partenaires - la nesprine 2 et la filamine A - dans le processus de migration du corps basal (Dawe, Smith, et al. 2007; Dawe et al. 2009; Adams et al. 2011). Meckeline est une protéine transmembranaire localisant à la fois au cil primaire et aux filaments d'actine. La nesprine 2 est une protéine de l'enveloppe externe du noyau pouvant également se lier aux filaments d'actine. La filamine A est une protéine associée à l'actine participant à l'organisation du cytosquelette d'actine et se localise à la fois au corps basal et à la membrane apicale. Le défaut de migration en réponse à l'absence de meckeline, nesprine 2 ou de la filamine A est associé à une dérégulation de l'activité de RhoA et par conséquent à un remodelage du cytosquelette d'actine empêchant la migration du centrosome.

L'isoforme MYH10 (ou myosine 2b) de la myosine II non musculaire a été identifiée pour moduler positivement la ciliogénèse et contrôler la migration du corps basal (Kim et al. 2010; Rao et al. 2014). Elle contribue à la régulation de la dynamique de l'actine. Cette dernière est d'une part cruciale pour l'apport de composants essentiels à la formation de la structure transitoire péricentriolaire PPC. D'autre part, en s'associant avec l'eitrine au cortex, l'actine permet un site privilégié pour l'ancrage du corps basal. Le défaut de migration du corps basal dans les cellules hTERT-RPE1 déficientes en MYH10 est donc la conséquence d'une désorganisation structurale du cortex (Hong et al. 2015). Au regard de la localisation de cette protéine au corps basal, une association avec le cytosquelette d'actine pourrait être envisagée. Dans ce cas, une implication directe de la myosine II centrosomale dans la migration n'est pas à exclure (Hong et al. 2015).

III. Réorganisation du réseau de microtubules lors de la ciliogénèse

Bien que la réorganisation de l'actine ainsi que la dynamique de certains types de structure d'actine sont des aspects critiques et incontournables pour que le mouvement et l'ancrage des corps basaux soient effectifs, ceux du réseau de microtubules sont encore mal compris. Des changements de modifications post-traductionnelles de la tubuline ont lieu lors de la polarisation des cellules MDCK notamment. Les microtubules dirigés vers le front avant dans les cellules non différenciés sont majoritairement détyrosinés, tandis que de nombreux microtubules orientés vers le domaine apical sont acétylés lorsque les cellules sont polarisées. Cependant, ces différentes modifications ne corrélaient pas avec une augmentation de la stabilité des microtubules (Quinones et al. 2011). A ce jour, leur rôle reste énigmatique. Il est supposé que certaines modifications pourraient permettre des fonctionnalités variées comme une augmentation de l'affinité de certains types de moteurs ou encore un trafic favorisé de vésicules vers une région spécifique. Il est intrigant de constater que certaines protéines ciliaires ou de polarité sont impliquées dans le processus de stabilité des microtubules: Kif17, BBIP10, Cep70 et les septines (Jaulin & Kreitzer 2010; Loktev et al. 2008; Shi et al. 2015; Bowen et al. 2011). D'autre part, l'activité de MYH10 est induite par une augmentation de l'acétylation des microtubules via une acétyltransférase α TAT1/MEC17 (Rao et al. 2014). Le rôle de cette stabilité induite par ces différentes protéines dans le processus ciliogénique reste encore à déterminer.

Par ailleurs, l'augmentation de la longueur du cil suite à un changement du cytosquelette d'actine est associée à une augmentation du niveau de tubuline soluble présente dans le

cytoplasme (Sharma et al. 2011). L'incubation de la cytochalasine D dans différents types cellulaires augmente la fraction de tubuline libre. En revanche, les cellules prétraitées avec le taxol (agent stabilisant les microtubules, connu pour inhiber la ciliogénèse) puis traitées avec la cytochalasine D ont une fraction de tubuline libre diminuée et ne présentent pas de cils allongés. De plus, l'addition de faibles quantités de nocodazole (100 nM) provoque un allongement des cils. Toutes ces données montrent une corrélation (directe ou indirecte) entre architecture de l'actine, présence de tubuline libre et longueur du cil.

Il est bien établi que le cytosquelette d'actine participe à la migration et à l'ancrage du corps basal à la membrane apicale. Quant à l'implication du réseau de microtubules, elle commence à émerger mais reste encore très mal comprise. Afin de mieux explorer les mécanismes nécessaires au mouvement du corps basal lors de la ciliogénèse, nous avons développé un système expérimental basé sur l'utilisation de micro-patrons adhésifs recouverts de fibronectine. Cette technologie comporte de nombreux avantages. Elle permet le contrôle de l'étalement de la cellule inhérent à la surface imposée par la matrice extracellulaire régulant ainsi l'organisation du cytosquelette ainsi que le positionnement des organelles subcellulaires. Par ailleurs, le volume cellulaire induit par le confinement spatial facilite l'observation de la position du centrosome en z au cours du temps, indispensable pour l'étude de chaque étape de la ciliogénèse cytoplasmique. Grâce à l'expertise du laboratoire cytomorpholab (L Blanchoin et M. Théry) en la dynamique du cytosquelette d'une part et à la maîtrise de la réalisation de cribles à haut contenu (X. Gidrol), j'ai cherché à identifier le rôle des deux éléments du cytosquelette ainsi que la contribution de certains gènes ciliaires dans la migration du corps basal. Les résultats ont été exposés dans la partie suivante.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. La forme et la contractilité cellulaire régule la ciliogénèse

1. Introduction à l'article

La ciliogénèse est étudiée en règle générale *in vitro* grâce à la culture de cellules. Le cil primaire se formant lorsque les cellules entrent en quiescence, il est nécessaire de priver les cellules de sérum durant une période suffisamment longue (24/48h). D'autre part, il est établi que les cellules doivent être également cultivées à haute densité. Si la privation de sérum permet d'induire la sortie des cellules en G1/G0, quel est le rôle de la confluence cellulaire ? La confluence cellulaire permet dans certains types cellulaires également induire un arrêt de cycle par inhibition de contact. Alors la confluence apporte-t-elle un effet supplémentaire à l'arrêt de cycle induit par le retrait de sérum ou alors les cellules ont-elles besoin d'être confinées spatialement et/ou d'établir des contacts cellule/cellule ?

Afin de répondre à cette question, nous avons choisi de travailler avec des micro-patrons adhésifs. La distribution spatiale des adhésions permet de contraindre physiquement des cellules individuelles et de contrôler leur forme. Ainsi, l'architecture du cytosquelette et par conséquent le positionnement des organelles intracellulaires peuvent être contrôlés, ceci de façon reproductible (Théry et al. 2006; Théry 2010). L'utilisation des micro-patrons est un outil permettant l'analyse des conséquences phénotypiques issues des interactions entre la matrice extracellulaire et la cellule lors de divers processus biologiques, et ce dans une grande variété de modèles cellulaires (Théry 2010). De nombreuses études s'accordent à montrer que les propriétés physiques et mécaniques de l'environnement cellulaire contrôlent le devenir cellulaire.

Nous nous sommes ainsi demandés si la contrainte physique pouvait également influencer sur la capacité des cellules à développer un cil primaire. Dans un premier temps, nous avons recherché les meilleures conditions pour contraindre un groupe de cellules hTERT-RPE1 en supposant que les contacts cellule/cellule étaient nécessaires à la ciliogénèse. Nous avons été surpris de constater que les cellules individuelles, en arrêt dans le cycle et contraintes sur des micro-patrons étaient aussi capables de former un cil primaire. Nos travaux se sont donc centrés sur l'étude de la ciliogénèse de cellules uniques contraintes sur des disques. La technologie des micro-patrons adhésifs confère plusieurs avantages : la possibilité d'analyser à haut débit et de façon massivement parallèle la réponse cellulaire induite par le confinement spatial grâce d'une part à la disposition des micro-patrons en réseau, et d'autre part, à la normalisation des formes cellulaires. De plus, les cellules contraintes sur des petits disques tendent à devenir plus volumineuses que des cellules cultivées de façon conventionnelle en flacon de culture. L'étude du positionnement du corps basal en 3D se trouve ainsi facilitée, permettant de caractériser de façon plus détaillée chaque étape de la ciliogénèse.

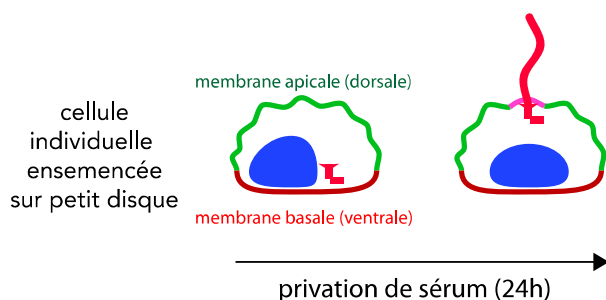


Figure 53 : Cellule individuelle hTERT-RPE1 ensemencée sur petit disque et privée de sérum avant et après 24h de privation de sérum (vue sur le côté).

L'axe noyau/centrosome se trouve alors dirigé vers le haut de la cellule. Le protocole que j'ai développé et utilisé durant ma thèse est décrit précisément dans la publication parue dans **Methods in enzymology** en annexe (Pitaval et al. 2013).

Ainsi la surface du micro-patron et par conséquent la surface d'étalement de la cellule permet de mimer le confinement spatial imposé par la densité cellulaire. Une cellule contrainte sur un petit micro-patron – en l'occurrence dans notre étude, un petit disque de $700\ \mu\text{m}^2$ – est confinée et mime la confluence cellulaire. A l'inverse, une cellule étalée sur un grand micro-patron de $3000\ \mu\text{m}^2$ reflète la faible densité cellulaire.

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'impact de l'organisation intracellulaire influencée par le confinement spatial sur la ciliogénèse.

2. Article

Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells.

Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., & Théry, M. (2010).

The Journal of Cell Biology, 191(2), 303–12.

Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle–arrested cells

Amandine Pitaval,¹ Qingzong Tseng,² Michel Bornens,³ and Manuel Théry²

¹Laboratoire Biopuces, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, 38054 Grenoble, Cedex 09, France

²Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, Institut National de la Recherche Agronomique, 38054 Grenoble, Cedex 09, France

³Institut Curie, Unité Mixte de Recherche 144, Centre National de la Recherche Scientifique, 75006 Paris, Cedex 05, France

In most lineages, cell cycle exit is correlated with the growth of a primary cilium. We analyzed cell cycle exit and ciliogenesis in human retinal cells and found that, contrary to the classical view, not all cells exiting the cell division cycle generate a primary cilium. Using adhesive micropatterns to control individual cell spreading, we demonstrate that cell spatial confinement is a major regulator of ciliogenesis. When spatially confined, cells assemble a contractile actin network along their ventral surface and a protrusive network along their dorsal surface.

The nucleus–centrosome axis in confined cells is oriented toward the dorsal surface where the primary cilium is formed. In contrast, highly spread cells assemble mostly contractile actin bundles. The nucleus–centrosome axis of spread cells is oriented toward the ventral surface, where contractility prevented primary cilium growth. These results indicate that cell geometrical confinement affects cell polarity via the modulation of actin network architecture and thereby regulates basal body positioning and primary cilium growth.

Introduction

Tissue development and renewal rely on the spatial and temporal regulation of the balance between cell growth and quiescence. Most cells in tissues are quiescent. In vertebrates, these cells generally possess a primary cilium (Gerdes et al., 2009). It is widely considered that ciliogenesis is tightly coupled to the cell cycle (Wheatley, 1971; Santos and Reiter, 2008). In post-mitotic cells entering the G0 phase, the mother centriole differentiates into a basal body, anchoring itself to the plasma membrane and growing the cilium (Alieva and Vorobjev, 2004). When quiescent cells resume cell cycle, the cilium is resorbed (Tucker et al., 1979; Pugacheva et al., 2007). According to this classical view, quiescent cells are ciliated, whereas nonciliated cells are engaged in the cell cycle. However, several examples of differentiated, but not ciliated, cells in situ suggest that cell cycle exit might not be sufficient to induce ciliogenesis (Seeley and Nachury, 2010). The parameters regulating ciliogenesis in growth-arrested cells remain to be elucidated.

It has been concluded from experiments on cultured cells that cell cycle arrest and cell confluence are required for ciliogenesis (Wheatley et al., 1994). Primary cells progressively

stop cycling after a limited number of passages, and immortalized cell lines stop cycling upon serum starvation and deprivation of growth factors. In both cases, a high level of confluence seems necessary to grow the primary cilium (Alieva and Vorobjev, 2004). However, because contact inhibition in confluent cells is known to induce cell growth arrest, it is not clear whether confluence affects ciliogenesis by promoting cell quiescence or by playing a more direct role on ciliogenesis. We designed specific tools and methodology to control separately the degree of cell confluence and cell cycle exit. We then analyzed the parameters governing ciliogenesis in cell cycle–arrested cells.

Results and discussion

Human retinal pigment epithelial (RPE1) cells are diploid immortalized cells that maintain normal checkpoints on cell cycle progression as well as contact inhibition of growth. We confirmed the role of cell confluence in ciliogenesis in these cells

Correspondence to Manuel Théry: manuel.thery@cea.fr

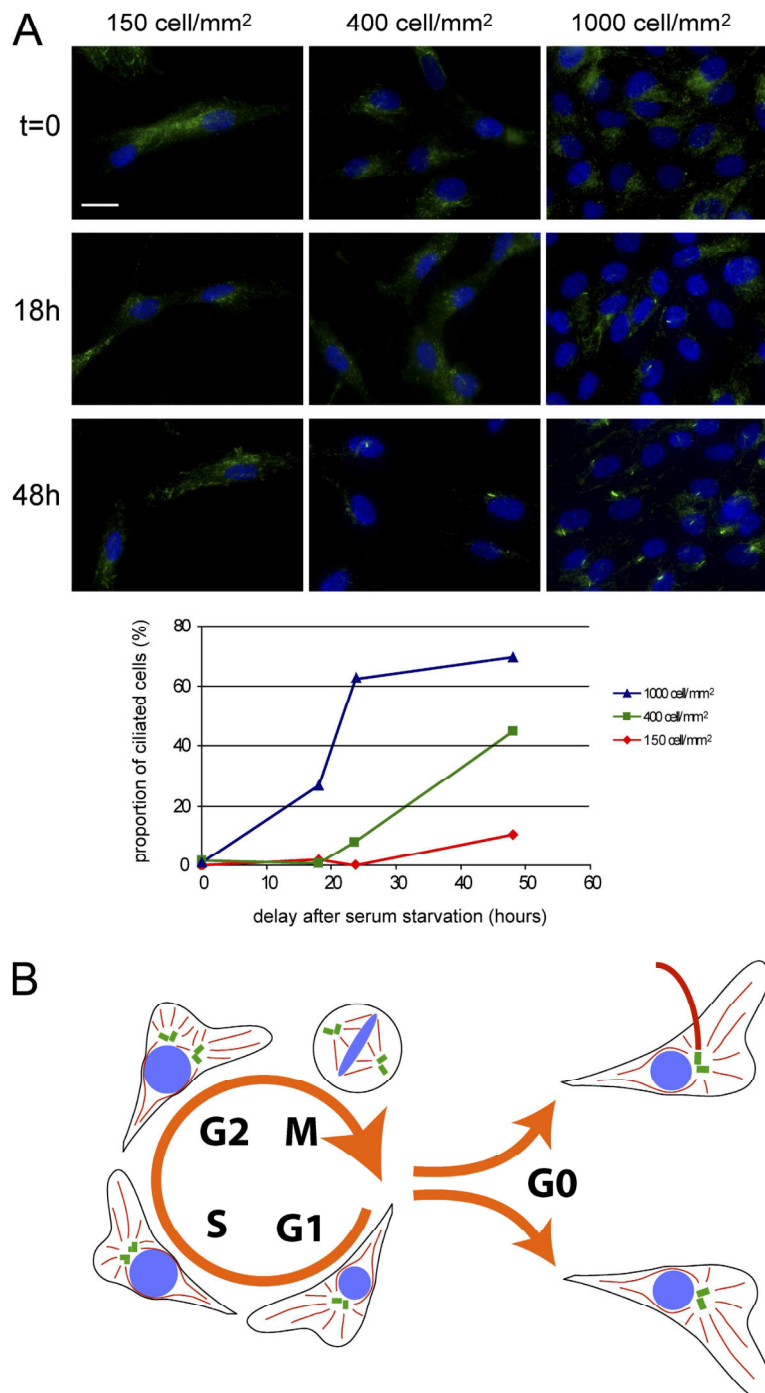
Abbreviation used in this paper: RPE1, human retinal pigment epithelial.

The Rockefeller University Press \$30.00
J. Cell Biol. Vol. 191 No. 2 303–312
www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201004003

© 2010 Pitaval et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>].

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2010/10/15/jcb.201004003.DC1.html>
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2010/10/18/jcb.201004003.DC2.html>
Original image data can be found at:
<http://jcb-dataviewer.rupress.org/jcb/browse/3211>

Figure 1. Growth arrest, confluency, and ciliogenesis. (A) RPE1 cells were plated on polystyrene-coated glass coverslips at various densities and serum starved. At different time points, cells were fixed and labeled for acetylated tubulin (green) to reveal primary cilia and DNA (blue). The graph shows the quantification of the proportion of ciliated cells in these conditions (the number of quantified cells is given for every time point: 150 cells/mm², $n = 20, 50, 58$, and 34; 400 cells/mm², $n = 118, 183, 101$, and 171; and 1,000 cells/mm², $n = 174, 312, 108$, and 166). Bar, 10 μ m. (B) Working model: cells can adopt two distinct states in G0 with or without growing a primary cilium.



Downloaded from jcb.rupress.org on October 27, 2015

by plating RPE1 cells at various densities. Coverslips were then fixed at various time points after serum starvation and stained for primary cilium (Alieva et al., 1999). Few cells had primary cilium soon after starvation. However, 48 h later, a majority of

confluent cells had a cilium, whereas only a small proportion of dispersed cells had one (Fig. 1 A). We checked by video microscopy during 48 h that most cells had actually stopped dividing at all densities. This demonstrated that cells could exit the cycle

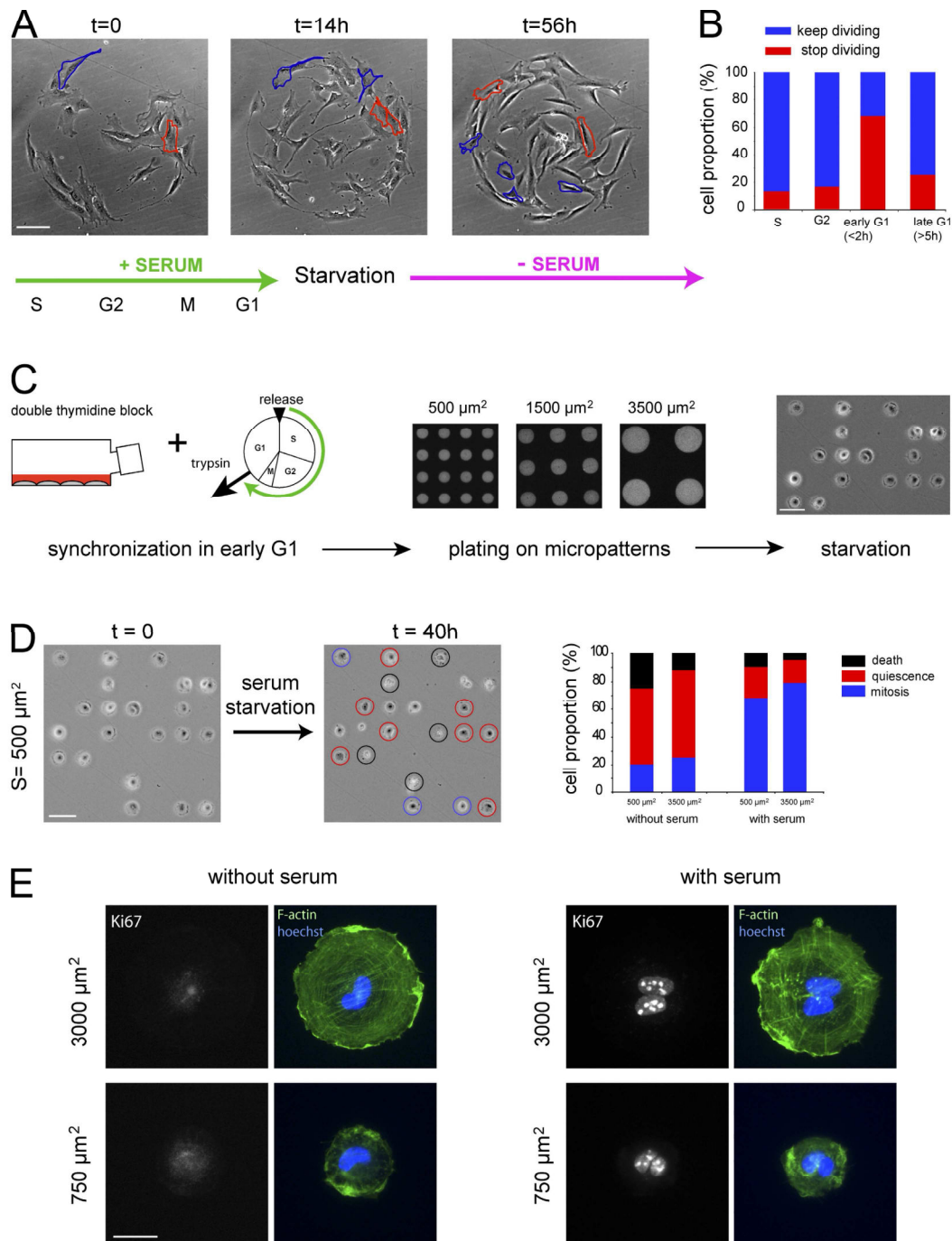


Figure 2. Cell cycle exit in G1. (A) Cells were plated on large, fibronectin-coated discoidal micropatterns to prevent them from escaping the observation field. They were monitored by time-lapse microscopy to measure cell division time with respect to the time of starvation and to follow the fate of daughter cells. The red cell illustrates starvation in early G1: the cell divided 2.5 h before starvation and stopped dividing after. The blue cell illustrates starvation in late G1: the cell divided 5 h before starvation and divided again after. See corresponding [Video 1](#) and [Fig. S1](#). Bar, 100 μm . (B) The histogram shows the proportion of dividing and nondividing cells, depending on the cell cycle stage when starvation occurred [S, $n = 31$; G2, $n = 31$; early G1 [<2 h after mitosis], $n = 92$; and late G1 [>5 h after mitosis], $n = 130$]. (C) Experimental procedure used for the following experiments. Cells were synchronized in early G1, plated on a micropatterned coverslip with 10 different sizes of discs ranging from 500 to 3,500 μm^2 , and serum starved. Bar, 50 μm .

with or without growing a primary cilium (Fig. 1 B) and that specific parameters associated with cell confluence seemed to regulate this fate.

We further investigated the role of cell spatial confinement and the presence of cell–cell contact on ciliogenesis by plating individual cells on micropatterned surfaces of defined sizes. To analyze cell cycle exit and ciliogenesis in these conditions, it was necessary to determine the exact time window in which cells could be plated on micropatterns and serum starved to obtain cell cycle exit before any further division. Therefore, we investigated the cell response to serum starvation all along the cell division cycle (Fig. 2 A and Fig. S1). As expected from previous studies (Pardee, 1974; Zetterberg and Larsson, 1985), most cells starved in early G1 did not reenter the cell cycle (Fig. 2 B). We thus proceeded as follows: cells were synchronized in early G1, plated on individual micropatterns, and starved. The role of cell confinement was tested by using an array of discoidal micropatterns of various sizes ranging from 500 to 3,500 μm^2 (Fig. 2 C).

Because cell spreading has been shown to positively regulate cell cycle progression (Chen et al., 1997; Huang et al., 1998; Schwartz and Assoian, 2001), we checked whether RPE1 cells actually left the cell cycle on all micropattern sizes. Just after spreading, cells were starved and monitored by video microscopy. Cells on small or large micropatterns left the cell cycle in similar proportions (Fig. 2, D and E). Control non-starved cells kept on dividing. We concluded that cell cycle exit was specifically induced by serum starvation independently of the extent of cell spreading.

Dramatic differences in the ciliation rate 48 h after serum starvation were observed, depending on the size of the micropatterns. Although cilia were present on most cells confined on small micropatterns, they became less frequent as cell spreading increased (Fig. 3, A and B). Most of the highly spread cells had exited cell cycle without growing a cilium. Instead, these cells displayed a large network of acetylated microtubules in their cytoplasm. In addition, the mean primary cilium length decreased from 5 to 2 μm as cell spreading increased (Fig. 3 C). Long cilium, >6 μm , could only be observed in spatially confined cells. These differences were already present 24 h after starvation and maintained for at least 72 h (Fig. 3, D and E), suggesting they were not caused by a delay in basal body maturation (Anderson and Stearns, 2009). When two cells were found on the same micropattern, each cell adopted half of the area, and their ciliation rate matched that of individual cells on micropatterns twice as small (Fig. 3 B). Therefore, cell–cell contact did not seem to be required for, nor regulate, ciliogenesis in these cells. Until now, primary cilium growth defects in cell cycle–arrested cells had only been seen in cells in which basal body integrity (Graser et al., 2007; Mikule et al., 2007),

centrosome-associated cell cycle regulation (Spektor et al., 2007), or intraflagellar transport (Schneider et al., 2005) required for ciliogenesis was specifically impaired. Our results demonstrate a strong dependency of ciliogenesis on the degree of cell shape extension in wild-type cells.

The degree of cell spreading affects actin network architecture. As cell spreading increased, cells displayed larger transversal stress fibers and more circumferential bundles (Fig. 3 A). Because actin dynamics have been shown to affect ciliogenesis (Kim et al., 2010), we tested whether these actin structures were involved in the cell shape–associated regulation of primary cilium growth by disrupting actin network integrity with 1 μM cytochalasin D. Several large cells managed to maintain their spreading, whereas their actin network was damaged. Interestingly, after a 24-h starvation in the presence of cytochalasin D, most cells, regardless of their size, were ciliated (Fig. 4 A). In addition, cilium length was no longer reduced in large cells; instead, large cells had slightly longer cilia. The actin network, therefore, appeared fully responsible for the regulation of ciliogenesis in response to cell shape extension.

We then looked for more specific actin structures that could be implicated in this regulation. The location of myosin II strongly affects actin network architecture and thus plays a key role in the establishment of cell polarity at all stages of organism development (St Johnston and Ahringer, 2010). In epithelial cells, ezrin is restricted to the apical pole where, upon phosphorylation, it links the polymerizing actin meshwork in membrane protrusion to the plasma membrane (Dard et al., 2004; Fievet et al., 2004). After 24 h of serum starvation, RPE1 cells confined on small micropatterns displayed a polarized actin network with myosin II–positive actin bundles at their ventral surface and an ezrin-rich actin meshwork at their dorsal surface (Fig. 4 B and Fig. S2). In extended cells, the actin network architecture appeared less polarized. Ezrin staining at the cell dorsal surface appeared fainter and more dispersed. Most actin structures were strongly decorated with myosin II (Fig. 4 B and Fig. S2). Indeed, cell shape extension has been correlated to high levels of actomyosin contraction (McBeath et al., 2004; Polte et al., 2004). Because up-regulation of RhoA in response to the loss of meckelin, a transmembrane protein of the primary cilium, has been shown to induce the formation of stress fibers and prevent primary cilium growth (Dawe et al., 2009), high levels of contraction could be responsible for the impaired ciliogenesis in spread cells.

To test this hypothesis, cell contractility was inhibited with either 10 μM Y27632, to inactivate Rho kinase, or with 50 μM blebbistatin, to inactivate myosin II ATPase. Both treatments induced actomyosin relaxation of spread cells as revealed by the large reduction of phosphomyosin II staining (Fig. 4 B). Interestingly, the proportion of ciliated cells in relaxed spread cells

(D) G1-starved cells on micropatterns were observed in time-lapse phase-contrast microscopy over 40 h. The proportion of dividing cells (blue), nondividing cells (red), and dying cells (black) were quantified in cells plated on the smallest (500 μm^2) and largest (3,500 μm^2) micropatterns in the presence ($n = 116$ and 43, respectively) or absence ($n = 123$ and 115, respectively) of serum. No clear difference could be observed between the two cell sizes. Bar, 50 μm . (E) Cell quiescence. Cells were plated on micropatterns with or without serum, fixed, and stained for Ki67 (proliferation marker), F-actin (green), and DNA (blue). A large majority of individual cells on small and large micropatterns were quiescent after 24 h of serum starvation, as revealed by their negative Ki67 staining (75%, $n = 102$; and 79%, $n = 174$; respectively). Cells proliferated in the presence of serum and were mostly Ki67 positive. Bar, 10 μm .

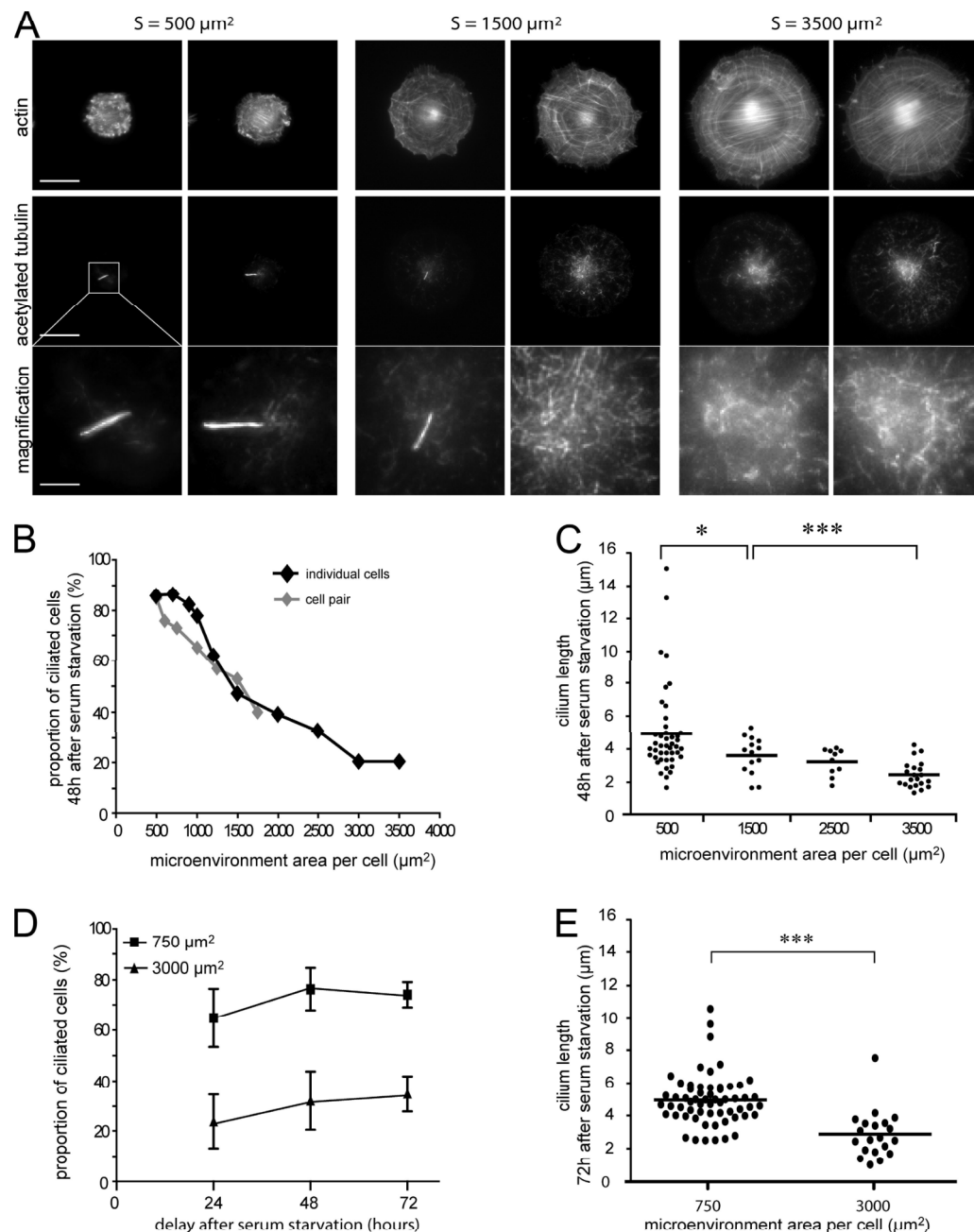


Figure 3. Cell confinement and ciliogenesis. The experimental procedure for all panels is described in Fig. 2 C. (A) Cells on various micropattern sizes were serum starved for 48 h, fixed, and stained for F-actin (top) and acetylated tubulin (bottom with an inset magnification) to reveal the primary cilium. Two examples of cells on 500, 1,500, and 3,500 μm^2 are shown to illustrate that most cells on 500 μm^2 had a primary cilium, half had one on 1,500 μm^2 , and most cells on 3,500 μm^2 had no primary cilium. Bars, 20 μm . Inset bar, 4 μm . (B) The proportion of individual ciliated cells on 10 different micropattern sizes ($n > 100$ for each) is shown with the black curve. The proportion of ciliated cells in cell doublets (two cells per pattern) on 10 different micropattern sizes ($n > 100$ for each) is shown with the gray curve with respect to individual cell size. (C) Quantification of primary cilium length depending on micropattern size. Primary cilium length was shorter in larger micropatterned cells. (D) Quantification of ciliated cell frequency in cells plated on small (750 μm^2) and large (3,000 μm^2) micropatterns over time ($n > 170$ for each). The rate slightly increased from 24 to 48 h and then reached a plateau. (E) Quantification of primary cilium length on small (750 μm^2) and large (3,000 μm^2) micropatterns 72 h after serum starvation. Primary cilium length was similar to the one measured 24 h after serum starvation (compare with C). *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$. Plotted bars represent standard deviations. Horizontal bars represent mean values.

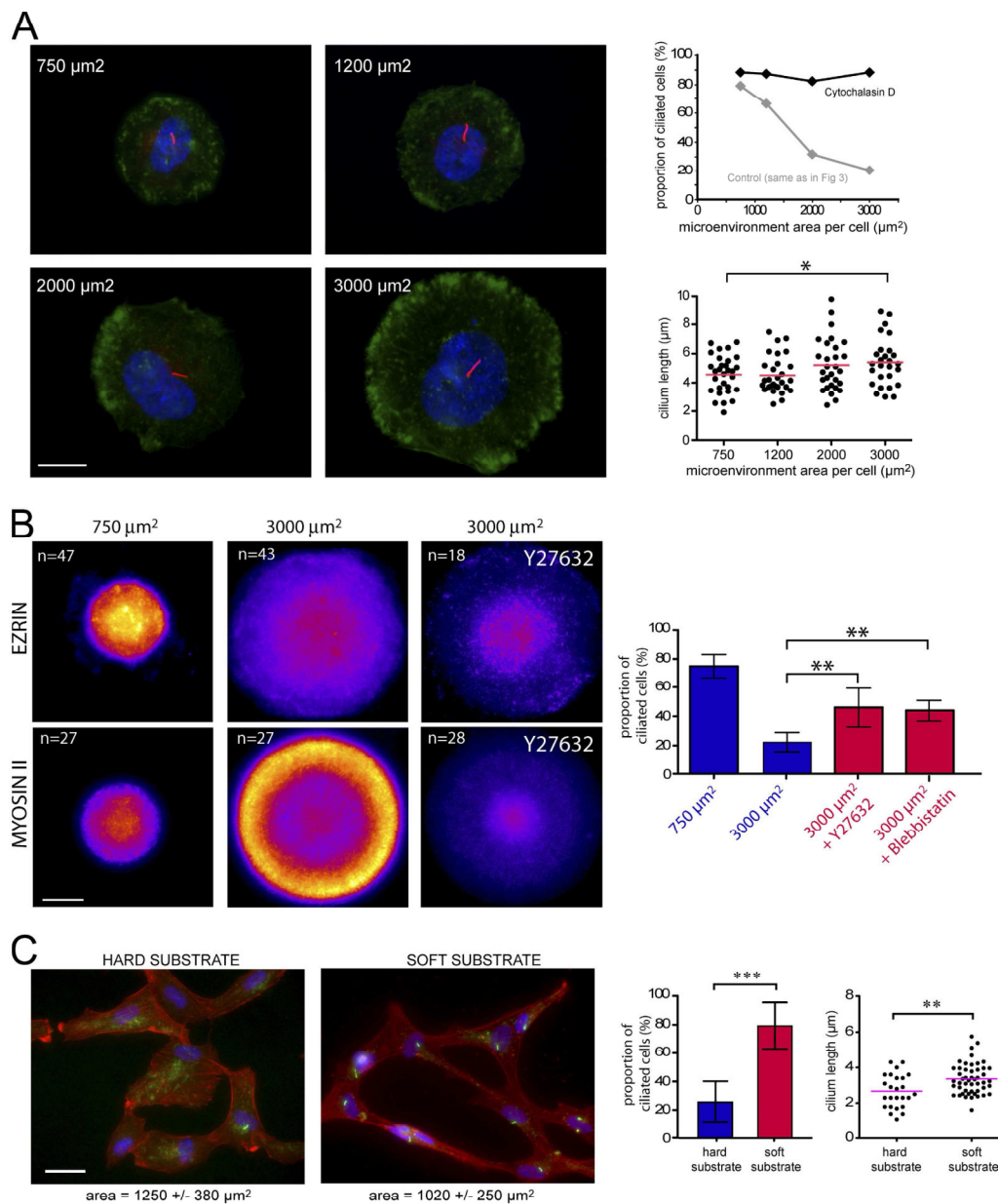


Figure 4. Actin network assembly, contractility, and ciliogenesis. The experimental procedure for A and B is described in Fig. 2 C. RPE1 cells were plated on micropatterns (from 750 to 3,000 μm^2) and serum starved for 24 h. (A) Micropatterned cells were treated with cytochalasin D during starvation. Cells were fixed and stained for acetylated tubulin (red), F-actin (green), and DNA (blue). Primary cilium occurrence (top, $n = 82, 97, 82$, and 41) and length (bottom, $n = 30, 26, 27$, and 25) were measured in cells whose shape still covered the entire micropattern after the treatment. Bar, 5 μm . (B) Micropatterned cells were treated with either Y27632 or blebbistatin during starvation. Cells were then fixed and immunolabeled for phosphoezrin (top) and phosphomyosin II (bottom). Z acquisitions were performed and projected on a single image containing the maximal intensity of each pixel. Several images on each micropattern were averaged and color coded with the fire look-up table to highlight intensity variations. Bar, 5 μm . Primary cilium occurrence was measured in each condition ($n > 400$ for each). (C) RPE1 cells in early G1 were plated at low density on hard substrate (polystyrene-coated glass coverslips) or soft substrate (polyacrylamide gel grafted on glass coverslips). Cells were then serum starved for 48 h, fixed, and stained for F-actin (red), DNA (blue), and acetylated tubulin (green). Most cells on hard substrates had no primary cilium (left). A majority of cells on soft substrates were ciliated (right). Primary cilium occurrence was measured at a cell density of 200 cells/ mm^2 on hard substrates ($n = 300$) and on soft substrates ($n = 1,140$). Primary cilium length was shorter on hard substrates than on soft ones. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.001$. Plotted bars represent standard deviations. Horizontal bars represent mean values. Bar, 20 μm .

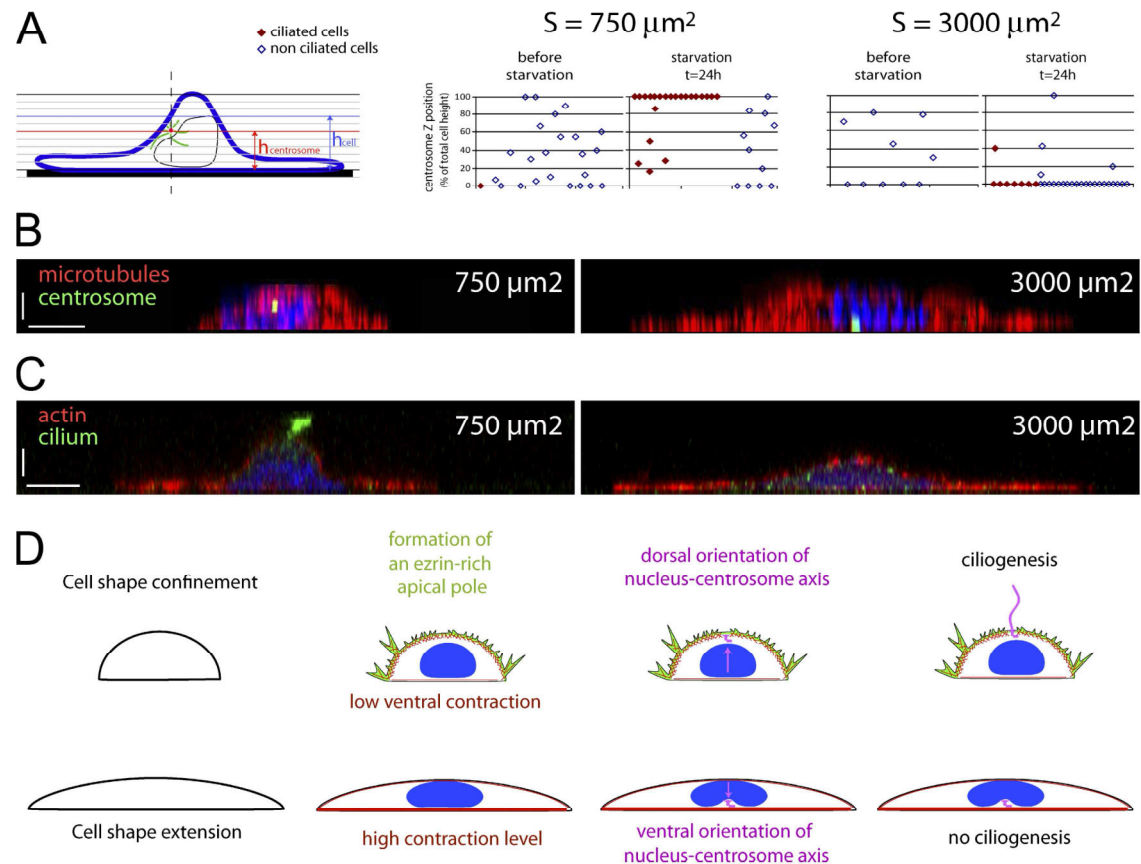


Figure 5. Cell shape regulates cell polarity and ciliogenesis. The experimental procedure is described in Fig. 2 C. RPE1 cells were plated on small ($750 \mu\text{m}^2$) and large ($3,000 \mu\text{m}^2$) micropatterns and serum starved for 24 h. (A) Micropatterned cells were fixed and immunolabeled to reveal primary cilium, centrosome/basal body, actin filaments, and nucleus (Fig. S3 A). Z stacks were performed to measure centrosome position. The ratio between centrosome position and local cell height was measured in confined and extended cells before and 24 h after serum starvation in ciliated and nonciliated cells. (B) Micropatterned cells were fixed in cold methanol and immunolabeled for γ -tubulin to reveal the centrosome (green) and immunolabeled with α -tubulin to reveal microtubules (red). DNA is in blue. Z stacks were acquired and deconvolved to detect centrosome positioning (Fig. S3 B). XZ optical sections illustrate centrosome positioning above the nucleus in confined cells (left) and below the nucleus in spread cells (right). (C) Micropatterned cells were fixed with paraformaldehyde, immunolabeled for acetylated tubulin (green), and stained with phalloidin (red; Fig. S3 C). DNA is in blue. XZ optical sections illustrate the presence of the primary cilium at the dorsal surface of confined cells (left) and the presence of acetylated microtubules in the cytoplasm of spread cells (right). (D) Results summary. When cells are spatially confined, they develop a polarized actin architecture with contractile bundles in the ventral surface and a polymerizing network in membrane protrusions at the dorsal surface. In these cells, the nucleus-centrosome axis is reproducibly oriented toward the dorsal surface in a Rho kinase-dependent manner. The apical positioning of the centrosome and its anchoring in the ezrin-rich actin network promote the formation of the primary cilium. When cells are highly extended, the actin network is unbalanced toward the formation of numerous and large contractile bundles. The internal polarity is reversed compared with confined cells. The nucleus-centrosome axis is oriented toward the ventral surface in an actin- and microtubule-dependent manner. The centrosome is in close proximity to actin stress fibers, whose contractility prevents the extension of the primary cilium. X bars, 5 μm . Z bars, 2 μm .

was twice that of control spread cells in both cases (Fig. 4 B). It is noteworthy that no significant effect could be detected on mean primary cilium length (control: $2.9 \pm 1.5 \mu\text{m}$, $n = 20$; blebbistatin: $2.9 \pm 1 \mu\text{m}$, $n = 30$; and Y27632: $3.6 \pm 1 \mu\text{m}$, $n = 30$).

To further confirm the negative regulation of cell contraction on ciliogenesis, we plated cells on soft substrates to release cell contraction (Polte et al., 2004; Engler et al., 2006; Solon et al., 2007). Cells displayed large and straight stress fibers on hard substrates but thinner and looser bundles on soft substrates (Fig. S2 D). Strikingly, although only 25% of sparsely populated cells had a primary cilium on hard substrate

(polystyrene), almost 80% were ciliated on soft substrates (polyacrylamide gel; Fig. 4 C). In addition, cilia were longer. Altogether, these results demonstrated that, in quiescent cells, the high level of contraction associated with cell spreading hindered ciliogenesis.

Rho kinase is also known to regulate centrosome positioning (Chevrier et al., 2002). Because early stages of ciliogenesis rely on basal body migration and docking to the plasma membrane, we wondered whether actin architecture and myosin II activity could play a role in basal body positioning. After serum starvation, the basal body was found to migrate above

the nucleus, to the ezrin-rich cell dorsal surface of confined cells, where they could grow a primary cilium. However, in starved spread cells, basal bodies were found below the nucleus, in contact with the ventral surface where they rarely formed a primary cilium (Fig. 5, A–C and Fig. S3 B). Dorsal positioning of basal body and ciliogenesis appeared to be tightly coupled (Fig. S3 D). After cytochalasin D treatment, basal bodies adopted a dorsal position, and ciliogenesis was improved (Fig. S3, B and D). After Rho kinase inhibition in confined cells, basal bodies were positioned below the nucleus, and ciliogenesis was reduced (Fig. S3, B and D). Inhibition of cell contractility in confined cells did not affect cilium length (control: $5 \pm 1.5 \mu\text{m}$, $n = 60$; Y27632: $5.3 \pm 2 \mu\text{m}$, $n = 37$; and blebbistatin: $5.1 \pm 2.5 \mu\text{m}$, $n = 34$). As previously suggested from RhoA inhibition in multiciliated cells (Park et al., 2006; Pan et al., 2007), this showed that Rho kinase activity is necessary for the apical positioning of the basal body and the subsequent growth of the primary cilium. However, in extended cells, Rho kinase inhibition did not affect the ventral positioning of basal bodies but promoted the growth of ventral cilia. This showed that cell contractility acts separately on both cilium extension and basal body positioning.

In this study, we thus report a major role for physical parameters such as spatial confinement and substrate rigidity, which, through their effect on actin cytoskeleton architecture, regulate ciliogenesis at cell cycle exit (Fig. 5 D). When individual cells were sufficiently spatially confined on adhesive substrate, they could assemble both a contractile ventral domain and a protrusive, ezrin-rich dorsal domain mimicking the apico-basal polarity of epithelial cells. This polarization was further transmitted to the internal cell organization with the nucleus-centrosome axis oriented toward the dorsal surface in a Rho kinase-dependent manner. Under these conditions, most cells assemble a primary cilium. When individual cells were highly spread, they mostly formed a highly contracted actin network in contact with their adhesive substrate. In this case, the internal polarity was reversed: the nucleus-centrosome axis was oriented toward the ventral surface. In this position, below the nucleus, and in proximity with stress fibers, the centrosome could not induce the growth of the primary cilium. This was partially a result of the local contractility of the cell cortex. Overall, these results demonstrate that cell cycle exit is not sufficient to induce primary cilium growth. Depending on the global organization of actin cytoskeleton architecture and dynamics, cells can enter a quiescent state with or without assembling a primary cilium. Whether such a regulation occurs during development could have far-reaching consequences given the sensory functions of primary cilia.

Materials and methods

Cell culture

Human telomerase-immortalized, retinal-pigmented epithelial cells (hTERT-RPE1; Takara Bio Inc.) were grown at 37°C and 5% CO_2 in DME/F12 (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin. We used a double thymidine block to synchronize cells at the G1/S transition. Cells in a culture flask were treated with 5 mM thymidine for 16 h, released for 8 h with normal culture medium, and then were treated again with thymidine for 16 h.

To detect cilium incidence of G1-enriched cells on micropatterns, cells were trypsinized just after mitosis (10 h after release of G1/S synchronization) and plated on the micropatterned coverslip ($10,000 \text{ cells}/\text{cm}^2$) to obtain a majority of patterns with individual cells. Medium was gently flushed over cells and replaced with fresh medium 0.5–1 h later to remove nonattached cells in suspension. Serum was then removed 1 h later, and cells were cultured for 24–72 h.

Cytoskeletal drugs were added to the medium when the serum was removed, i.e., 2 h after the plating of cells on micropatterns. For Rho kinase inhibition, Y27632 was added at 10 μM . For myosin II ATPase inhibition, blebbistatin was added at 50 μM . For actin network destabilization, cytochalasin D was added at 1 μM 2 h after serum removal to allow starved cells to fully spread on large micropatterns before being treated.

Micropatterning

Glass coverslips were first spin coated with an adhesion promoter (TI Prime; MicroChemicals) and then with 0.5% polystyrene dissolved in toluene at 3,000 rpm for 30 s. The polystyrene layer was further oxidized with an oxygen plasma treatment (FEMTO; Diener Electronics) for 10 s at 30 W and incubated with 0.1 mg/ml polylysine poly-ethylene-glycol (JenKem Technology) in 10 mM Hepes, pH 7.4, at room temperature for 1 h. Coverslips were then dried by spontaneous dewetting. Poly-ethylene-glycol-coated slides were placed in contact with an optical mask containing the transparent micropatterns (Toppan Photomasks, Inc.) using a home-made vacuum chamber and exposed for 3 min to deep UV light (UVO Cleaner; Jelight Company). Micropatterned slides were washed once in PBS and finally incubated for 30 min with a solution of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine fibronectin solution (Sigma-Aldrich) and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Alexa Fluor 646- or Alexa Fluor 542-labeled fibrinogen (Invitrogen). Before plating cells, patterned coverslips were washed three times with sterilized PBS. We also used commercially available micropatterned glass coverslips (CYTOOChips; Cytooo).

Soft substrate fabrication

Acrylamide monomer solution (Sigma-Aldrich) containing 5% acrylamide and 0.13% bisacrylamide was polymerized by ammonium persulfate (Sigma-Aldrich) and N,N,N,N -tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich) over a glass coverslip previously silanized with 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (Sigma-Aldrich). 25 mM 4-benzoylbenzyl-trimethylammonium chloride (benzophenone; custom synthesis by Sigma-Aldrich outsourced to Labotest) and fibronectin at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS were added on the surface of the polymerized gel and then exposed to UV light (Delolux Q3 S; Supratec) at 400 W for 45 s to graft the fibronectin using the photoactivation of benzophenone (Fink et al., 2007). The gel was washed with PBS before cell seeding.

Video microscopy and cell imaging

Time-lapse acquisitions were taken with an inverted microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Inc.). The temperature, CO_2 , and humidity control were performed using a Box and Brick system (Life Imaging Services). Multiple positions were recorded using an XY motorized stage (Marzhauser) with a 10-min time frame over 40–54 h with a dry 10 \times phase-contrast objective. Fluorescence images were taken using an upright microscope (BX61; Olympus). Cilium frequency was manually calculated on images taken either with a dry 20 \times objective (NA = 0.4) or with a dry 40 \times objective (NA = 0.9). Fluorescent images shown are maximal projections of Z stacks acquired with oil immersion objectives at either 63 \times or 100 \times (NA = 1.4) mounted on a piezo ceramic (Physics Instruments). Both microscopes were controlled with Metamorph software (MDS Analytical Technologies). Side views were obtained using XZ optical sections (not projections) of either classical epifluorescence Z stacks with a piezo or confocal Z stacks (15 planes separated by 500 nm) acquired with a confocal microscope (TCS-SP2; Leica) through a 63 \times objective (NA = 1.4).

Immunostaining

For immunostaining experiments, cells were plated on polystyrene-coated glass coverslips to promote cell attachment and keep a good optical quality. Coating was performed by spin coating 0.5% polystyrene solution in toluene at 3,000 rpm for 30 s. The polystyrene layer was further oxidized with an oxygen plasma treatment. Alternatively, cells were plated on micropatterned or soft substrates.

For actin-associated protein and primary cilium immunostaining, RPE1 cells were fixed in 4% paraformaldehyde in cytoskeleton buffer, pH 6.1, for 15 min at room temperature without any prior PBS wash. They were then rinsed twice with PBS and incubated in 0.1 M ammonium chloride in PBS for 10 min. Cells were then permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS

for 3 min and blocked with 3% BSA in PBS for 30 min. For phosphomyosin immunostaining, cells were permeabilized for 15 s with 0.1% Triton X-100 in cytoskeleton buffer before paraformaldehyde fixation. For centrosome detection, cells were fixed for 5 min in methanol at -20°C . For Ki67 immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 15 min at room temperature.

Primary monoclonal mouse antibodies against acetylated tubulin (1:10,000 dilution; Sigma-Aldrich) and α -tubulin (1:1,000; AbD Serotec) and primary polyclonal rabbit antibodies against phosphomyosin light chain 2 (1:100; Cell Signaling Technology), γ -tubulin (1:500; Abcam), and Ki67 (1:50; Invitrogen) were added in blocking buffer (1.5% BSA) for 1 h at room temperature. Primary polyclonal rabbit antibodies against phosphoezrin (1:600; Cell Signaling Technology) were added in blocking buffer overnight at 4°C .

The secondary antibodies Cy3- and Cy5-conjugated goat anti-mouse, goat anti-rat, and goat anti-rabbit (AffiniPure; Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.) were used at a dilution of 1:500 in 1.5% BSA and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich) for 45 min in the dark at room temperature. Cells were incubated in 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst for 5 min in PBS before mounting in Mowiol (Sigma-Aldrich).

Image processing

All of the images were processed using ImageJ (National Institutes of Health). For 3D reconstruction, images were first deconvolved using the 3D iterative deconvolution plugin by theoretical point-spread function. For the cilium images at low magnification (Fig. 1), maximum projection of Z stacks or the plugin Extended Depth of Focus was applied to visualize all the cilium in a single plane.

Quantification on images and statistical analysis

Fluorescence densities were measured on individual cells. Z stacks containing 20 images separated by 500 nm were projected along the Z axis using the maximal intensity of each pixel. We then quantified the ratio between the total fluorescence intensity and the cell area. The mean value of the image background around the cell was then subtracted from this value.

Compared experiments were taken together: cells were issued from a single pool and further fixed and immunolabeled with the same solution. Similarly, compared images were acquired the same day with the same acquisition parameters. Comparison between two sets of measures was performed using Student's *t* test (two tailed, 95% interval confidence: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Plotted bars represent standard deviations. *n* refers to the total number of measures.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the analysis of cell cycle exit. Fig. S2 shows the quantification of ezrin and myosin II densities in confined and extended cells. Fig. S3 shows the labeling and quantification of centrosome position. Video 1 shows the monitoring of cell fate upon serum starvation. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201004003/DC1>.

We would like to thank Annie Delouvée for providing advice about RPE1 culture conditions, Véronique Collin-Faure for FACS analyses, Emilie Mercey for designing the optical mask, as well as Joanne Young, Laurent Blanchoin, Enrique De La Cruz, Denys Wheatley, Erica Golemis, Maxence Nachury, and Matthieu Piel for critical reading of the manuscript and discussions.

This work has been conducted thanks to the grant Agence Nationale pour la Recherche Jeune Chercheur attributed to M. Théry (ANR-08JC-0103). The authors declare some conflict of interest because they are implicated in the company Cytos, which commercializes micropatterns.

Submitted: 1 April 2010

Accepted: 13 September 2010

References

Alieva, I.B., and I.A. Vorobjev. 2004. Vertebrate primary cilia: a sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a "sleeping beauty" in cultured cells? *Cell Biol. Int.* 28:139–150. doi:10.1016/j.cellbi.2003.11.013

Alieva, I.B., L.A. Gorgidze, Y.A. Komarova, O.A. Chernobelskaya, and I.A. Vorobjev. 1999. Experimental model for studying the primary cilia in tissue culture cells. *Membr. Cell Biol.* 12:895–905.

Anderson, C.T., and T. Stearns. 2009. Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. *Curr. Biol.* 19:1498–1502. doi:10.1016/j.cub.2009.07.034

Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*. 276:1425–1428. doi:10.1126/science.276.5317.1425

Chevrier, V., M. Piel, N. Collomb, Y. Saoudi, R. Frank, M. Paintrand, S. Narumiya, M. Bornens, and D. Job. 2002. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J. Cell Biol.* 157:807–817. doi:10.1083/jcb.200203034

Dard, N., S. Louvet-Vallée, A. Santa-Maria, and B. Maro. 2004. Phosphorylation of ezrin on threonine T567 plays a crucial role during compaction in the mouse early embryo. *Dev. Biol.* 271:87–97. doi:10.1016/j.ydbio.2004.03.024

Dawe, H.R., M. Adams, G. Wheway, K. Szymanska, C.V. Logan, A.A. Noegel, K. Gull, and C.A. Johnson. 2009. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 122:2716–2726. doi:10.1242/jcs.043794

Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044

Fievet, B.T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* 164:653–659. doi:10.1083/jcb.200307032

Fink, J., M. Théry, A. Azioune, R. Dupont, F. Chatelain, M. Bornens, and M. Piel. 2007. Comparative study and improvement of current cell micropatterning techniques. *Lab Chip*. 7:672–680. doi:10.1039/b618545b

Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*. 137:32–45. doi:10.1016/j.cell.2009.03.023

Graser, S., Y.D. Stierhof, S.B. Lavoie, O.S. Gassner, S. Lamla, M. Le Clech, and E.A. Nigg. 2007. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* 179:321–330. doi:10.1083/jcb.200707181

Huang, S., C.S. Chen, and D.E. Ingber. 1998. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol. Biol. Cell*. 9:3179–3193.

Kim, J., J.E. Lee, S. Heynen-Genel, E. Suyama, K. Ono, K. Lee, T. Ideker, P. Aza-Blanc, and J.G. Gleeson. 2010. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature*. 464:1048–1051. doi:10.1038/nature08895

McBeath, R., D.M. Pironi, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell*. 6:483–495. doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9

Mikule, K., B. Delaval, P. Kaldis, A. Jurczyk, P. Hergert, and S. Dossy. 2007. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat. Cell Biol.* 9:160–170. doi:10.1038/ncb1529

Pan, J., Y. You, T. Huang, and S.L. Brody. 2007. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J. Cell Sci.* 120:1868–1876. doi:10.1242/jcs.005306

Pardee, A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71:1286–1290. doi:10.1073/pnas.71.4.1286

Park, T.J., S.L. Haigo, and J.B. Wallingford. 2006. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturmed or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat. Genet.* 38:303–311. doi:10.1038/ng1753

Polte, T.R., G.S. Eichler, N. Wang, and D.E. Ingber. 2004. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C518–C528. doi:10.1152/ajpcell.00280.2003

Pugacheva, E.N., S.A. Jablonski, T.R. Hartman, E.P. Henske, and E.A. Golemis. 2007. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*. 129:1351–1363. doi:10.1016/j.cell.2007.04.035

Santos, N., and J.F. Reiter. 2008. Building it up and taking it down: the regulation of vertebrate ciliogenesis. *Dev. Dyn.* 237:1972–1981. doi:10.1002/dvdy.21540

Schneider, L., C.A. Clement, S.C. Teilmann, G.J. Pazour, E.K. Hoffmann, P. Satir, and S.T. Christensen. 2005. PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* 15:1861–1866. doi:10.1016/j.cub.2005.09.012

Schwartz, M.A., and R.K. Assoian. 2001. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell Sci.* 114:2553–2560.

Seeley, E.S., and M.V. Nachury. 2010. The perennal organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J. Cell Sci.* 123:511–518. doi:10.1242/jcs.061093

Solon, J., I. Levental, K. Sengupta, P.C. Georges, and P.A. Janmey. 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93:4453–4461. doi:10.1529/biophysj.106.101386

- Spektor, A., W.Y. Tsang, D. Khoo, and B.D. Dynlacht. 2007. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*. 130:678–690. doi:10.1016/j.cell.2007.06.027
- St Johnston, D., and J. Ahringer. 2010. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell*. 141:757–774. doi:10.1016/j.cell.2010.05.011
- Tucker, R.W., A.B. Pardee, and K. Fujiwara. 1979. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell*. 17:527–535. doi:10.1016/0092-8674(79)90261-7
- Wheatley, D.N. 1971. Cilia in cell-cultured fibroblasts. 3. Relationship between mitotic activity and cilium frequency in mouse 3T6 fibroblasts. *J. Anat.* 110:367–382.
- Wheatley, D.N., E.M. Feilen, Z. Yin, and S.P. Wheatley. 1994. Primary cilia in cultured mammalian cells: detection with an antibody against detyrosinated alpha-tubulin (ID5) and by electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 26:91–102.
- Zetterberg, A., and O. Larsson. 1985. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:5365–5369. doi:10.1073/pnas.82.16.5365

Supplemental material

JCB

Pitaval et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/JCB.201004003/DC1>

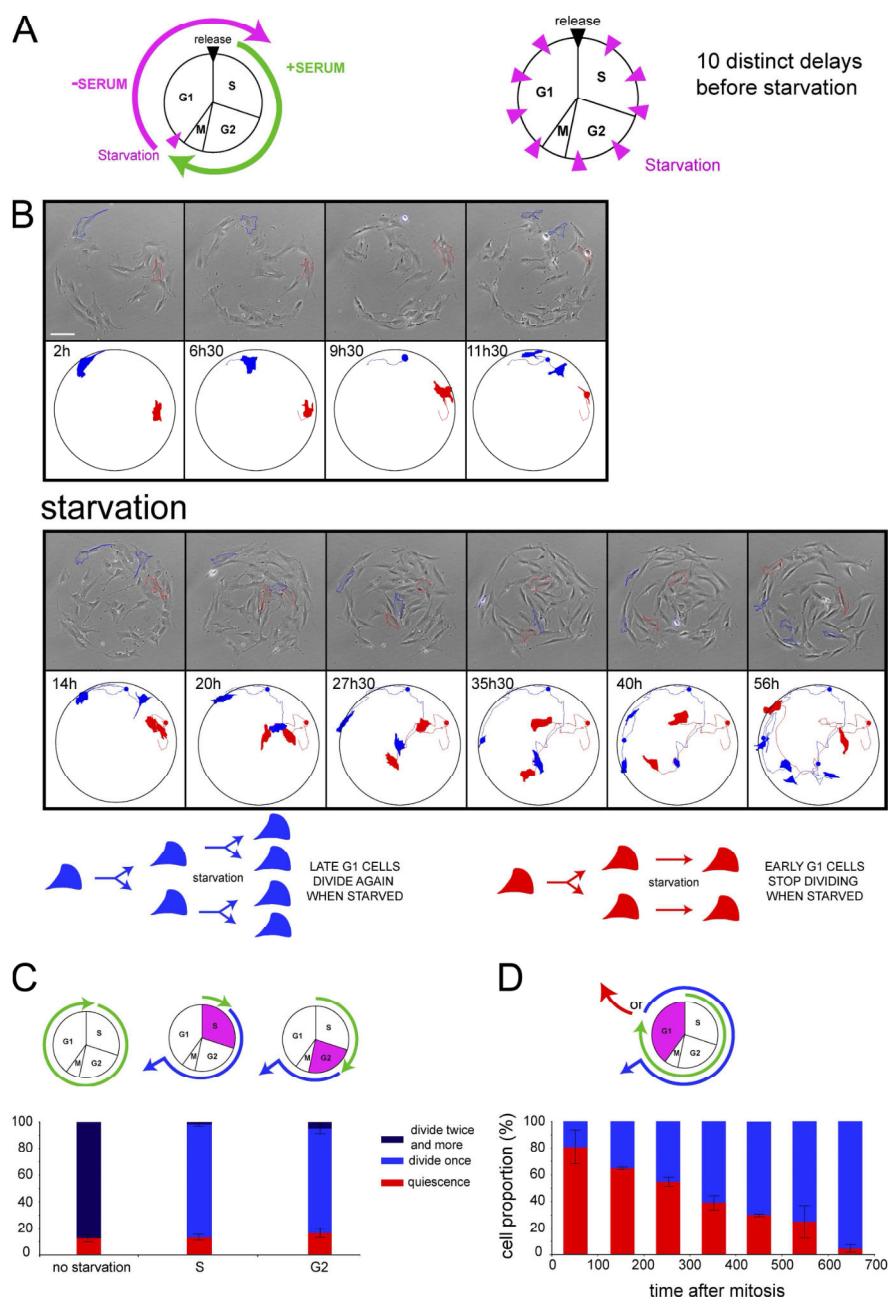


Figure S1. **Cell cycle exit analysis.** (A) Experimental procedure. RPE1 cells were synchronized at the G1/S transition and released with complete medium before being starved at various time points along the cell cycle in separated distinct experiments in a micropatterned 12-well plate. Cell behaviors were followed in time-lapse video microscopy. (B) Cells were plated on large, 500- μ m-wide, fibronectin-coated discoidal micropatterns and monitored in time-lapse phase-contrast microscopy over 54 h to measure cell division time with respect to the time of starvation and to observe daughter cell fates. A few examples are highlighted. The blue cell divided once in the presence of serum. The daughters were starved in late G1 and gave rise to four daughters over the entire experiment. The red cell divided once in the presence of serum. The daughters were starved in early G1 and didn't divide any longer ([Video 1](#)). Bar, 100 μ m. (C) Quantification of cell behavior upon serum starvation. The respective proportions of nondividing cells (red), cells dividing once (light blue), and cells dividing more than twice (dark blue) are shown on the histogram. The left bar shows cells that were not starved, and most cells divide several times ($n = 16$). In the middle bar, cells were starved in S phase, and in the right bar, cells were starved in G2 phase ($n = 31$ in both conditions). In these two cases, most cells divided once and then left the cell cycle. (D) Quantification of cell behavior upon serum starvation at various time points in G1. All cells divided once in the presence of serum and were starved in G1. The histogram shows the proportion of dividing cells (blue) and nondividing cells (red) depending on the duration between cell entry into G1 phase and the serum starvation time ($n = 44, 46, 26, 46, 20, 36$, and 28 , respectively). We observed a progressive reduction of cells exiting the cell cycle all along G1. Plotted bars represent standard deviations.

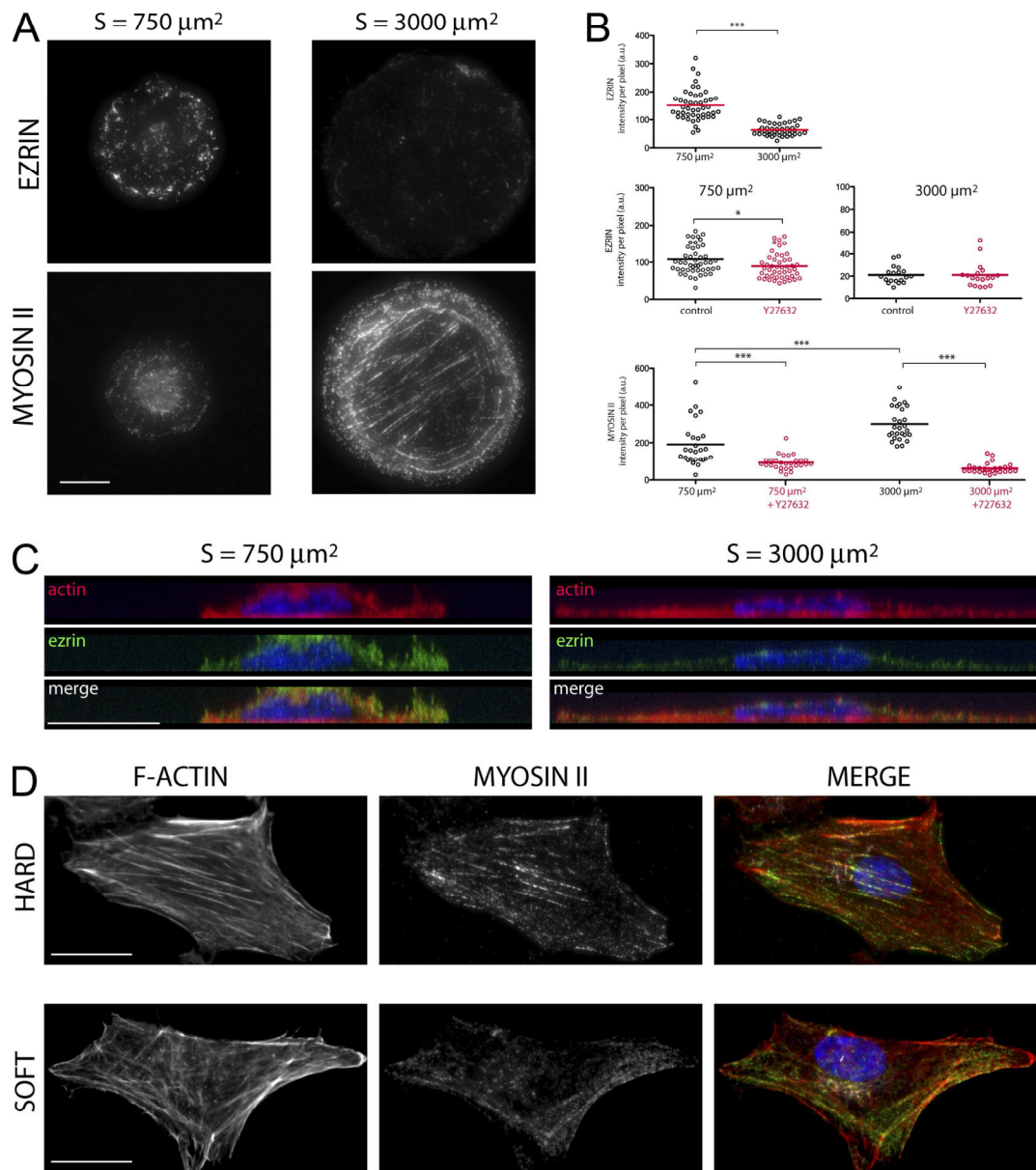


Figure S2. **Ezrin and myosin II localization and density.** (A) RPE1 cells on small ($750 \mu\text{m}^2$) and large ($3,000 \mu\text{m}^2$) micropatterns were fixed and immunolabeled for phosphoezrin (top) and phosphomyosin II (bottom). Z acquisitions were performed and projected on a single image containing the maximal intensity of each pixel. Grayscale images are identical for cells on small and large micropatterns. Ezrin staining reveals the presence of small microvilli only in confined cells. Myosin II staining decorates actin bundles in confined and spread cells, but these bundles are more conspicuous and numerous in spread cells. Bar, $5 \mu\text{m}$. (B) RPE1 cells were plated on small or large micropatterns and treated or not treated with $10 \mu\text{M}$ Y27632 in the absence of serum for 24 h. Cells were fixed and stained for phosphoezrin and phosphomyosin II. The mean intensity per pixel (after background subtraction) was measured on individual images and compared between the two micropattern sizes. Ezrin staining was more intense in confined than in spread cells (top). Y27632 treatment slightly reduced phosphoezrin densities in confined but not in spread cells (middle). Phosphomyosin II staining appeared more dense in spread than in confined cells. Y27632 treatment strongly reduced phosphomyosin II densities in both confined and spread cells (bottom). a.u., arbitrary units. (C) Confocal Z stack optical sections showing dense phosphoezrin staining on top of confined cells (left) and dispersed staining on top of extended cells (right), in which the basal concentration of actin fibers is higher than on small cells. Bar, $5 \mu\text{m}$. (D) RPE1 cells were plated on hard (polystyrene) and soft (polyacrylamide) substrates. They were starved for 24 h and stained for F-actin (left), phosphomyosin (middle), and acetylated tubulin (in white in the merge picture on the right). DNA is in blue. Actin bundles appeared thicker and straighter, and therefore probably more contracted, on hard than on soft substrate. *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$. Horizontal bars represent mean values. Bars, $20 \mu\text{m}$.

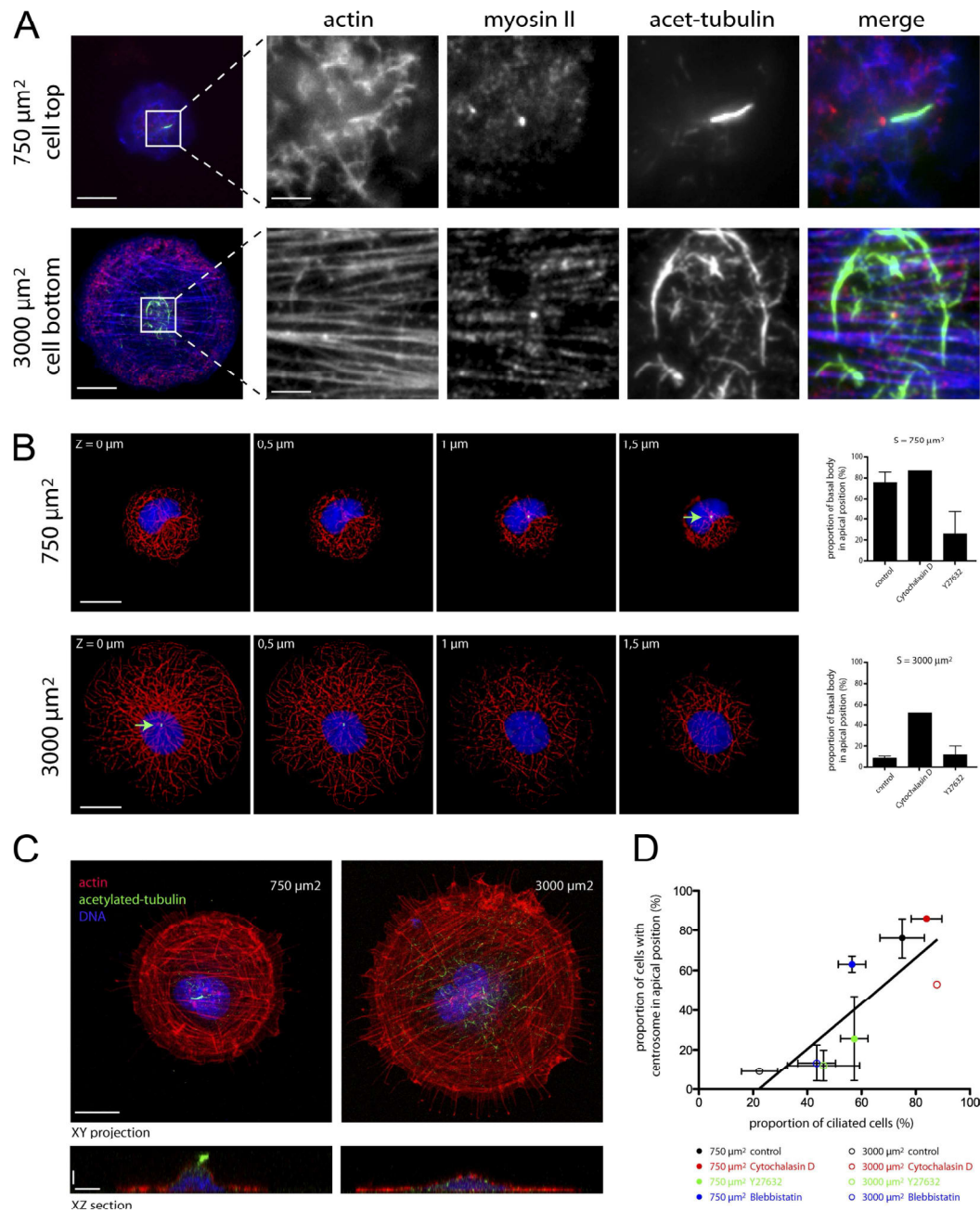
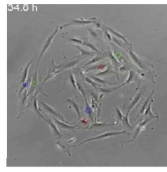


Figure S3. **Labeling and quantification of centrosome position.** RPE1 cells were plated on small (750 μm^2) and large (3,000 μm^2) micropatterns in the absence of serum for 24 h. (A) Micropatterned cells were fixed with paraformaldehyde. They were then immunolabeled for acetylated tubulin to reveal the primary cilium and/or cytoplasmic acetylated microtubules (green), immunolabeled for phosphomyosin II to detect the centrosome/basal body (red), and then stained with phalloidin to reveal actin filaments (blue) and Hoechst to reveal the nucleus (not depicted). The top row shows a primary cilium and the basal body on the dorsal surface of a cell confined on a small micropattern. The bottom row shows the acetylated microtubule network and the centrosome on the ventral surface of a cell spread on a large micropattern. Bars, 15 μm . Inset bars, 3 μm . (B) Micropatterned cells were fixed with cold methanol. They were then immunolabeled for α -tubulin to reveal microtubules (red), immunolabeled for γ -tubulin to reveal centrosomes (green), and stained with Hoechst to reveal nucleus (blue). Z acquisitions were performed to detect the position of the centrosome (green arrows). It was either found above the nucleus, close to the dorsal cell surface (top), or below the nucleus, close to the ventral cell surface (bottom). Bars, 15 μm . The proportion of centrosome/basal body in the apical position close to the dorsal cell surface was quantified in cells plated on small (top, 750 μm^2) and large (bottom, 3,000 μm^2) micropatterns in the presence of culture medium without serum (control) and various cytoskeletal inhibitors (750 μm^2 : control, $n = 84$; cytochalasin D, $n = 63$; Y27632, $n = 63$; 3000 μm^2 : control, $n = 84$; cytochalasin D, $n = 63$; Y27632, $n = 63$; Blebbistatin, $n = 63$).



Video 1. **Monitoring of cell fate upon serum starvation.** RPE1 cells were plated on large, 500- μm -wide, fibronectin-coated discoidal micropatterns and monitored in 10 \times time-lapse phase-contrast microscopy to measure cell division time with respect to the time of starvation and observe daughter cell fates. Time interval between two frames is 10 min. Colored dots are used as visual marks to follow individual cell fates. The blue cell's daughters were starved in late G1 and divided again. The red cell's daughters were starved in early G1 and didn't divide again. The green cell's daughters adopted asymmetric behaviors: one divided again and not the other.

= 101; and 3,000 μm^2 : control, $n = 49$; cytochalasin D, $n = 36$; Y27632, $n = 98$). (C) Micropatterned cells were fixed with paraformaldehyde. They were then immunolabeled for acetylated tubulin (green), stained with phalloidin to reveal actin filaments (red), and stained with Hoechst to reveal nucleus (blue). Confocal Z stacks were performed and were either projected on the XY plane or sectioned along the XZ plane. Side views show the location of primary cilium on top of confined cells (left) and the presence of acetylated microtubules instead of a primary cilium in the cytoplasm of extended cells (right). X bars, 5 μm . Z bar, 2 μm . (D) The proportion of ciliated cells (Fig. 4) after different treatments is plotted against the proportion of cells having their centrosome in an apical position, close to the dorsal cell surface (see B). The two parameters could be linearly correlated with a correlation factor $r^2 = 0.67$. Plotted bars represent standard deviations.

3. Conclusions générales

Ce travail a permis de mettre en évidence que :

- Une cellule seule, spatialement contrainte et en arrêt de cycle, est capable de développer un pôle apical (riche en actine et en ezrine phosphorylée) et de former un cil, dont le corps basal est ancré au domaine apical. L'axe noyau/centrosome se trouve orienté vers la membrane apicale (ou membrane dorsale)
- Le confinement spatial (petits disques) est directement corrélé avec la propension des cellules à pousser un cil
- Le contact cellule/cellule n'influe pas sur le taux de ciliogénèse dans les cellules hTERT-RPE1
- La contractilité et la formation du cil sont des processus mutuellement exclusifs. L'étalement des cellules sur les grands micro-patrons induit une contractilité des filaments d'actine présents à la surface ventrale. Cette contractilité empêche la formation d'un pôle apical, nuit à la migration du corps basal (maintenu sous le noyau) et par conséquent impacte négativement la ciliogénèse. Elle réduit considérablement la taille du cil quand il est présent.
- La souplesse de la matrice ((gel polyacrylamide) ou l'addition d'agents déstabilisateurs d'actine favorise la formation du cil des cellules fortement étalées

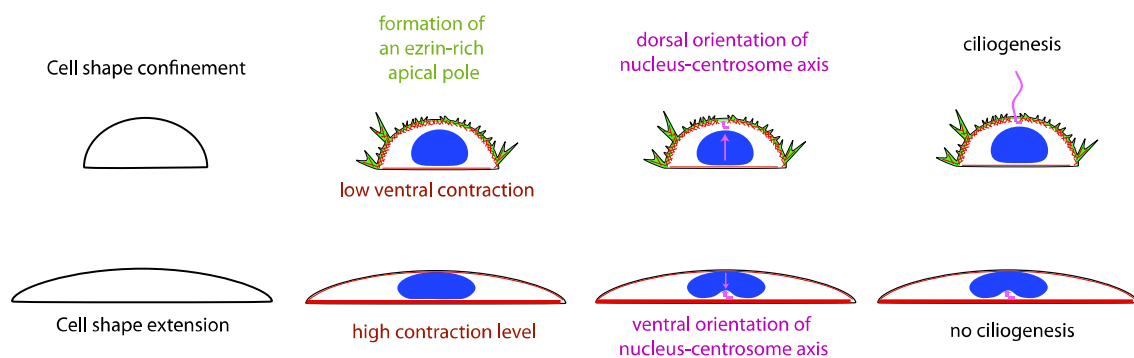


Figure 54 : Schéma illustrant l'effet de la forme cellulaire sur la position du corps basal et sur la formation du cil primaire. Figure extraite de Pitaval et al. (2010).

4. Discussions et perspectives

A. Le confinement spatial et le devenir cellulaire

La capacité de la cellule à former un cil primaire dépend donc du confinement spatial imposé à la cellule par le micro-patron adhésif. Une augmentation de l'étalement de la cellule compromet la migration du corps basal, lequel reste piégé sous le noyau. La contractilité des filaments d'actine en réponse à l'étalement des cellules empêche le processus de ciliogénèse. Il est par ailleurs établi que l'engagement des cellules vers une différenciation en adipocyte ou en ostéoblaste est lié à la contractilité de la cellule.

B. Confinement spatial, remodelage de l'actine et mécanotransduction

Comme vu précédemment, la contractilité des filaments d'actine induite par l'étalement des cellules affecte la différenciation cellulaire, la morphogénèse et la ciliogénèse. Comment le remodelage du cytosquelette d'actine influe-t-il sur ces processus ? Quel est le rôle de la contractilité de l'actine ?

En 2011, c'est à dire une année après la publication de notre article, l'équipe de Piccolo met tout d'abord en évidence le rôle de la mécanotransduction dans le contrôle de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en réponse au confinement spatial. La mécanotransduction est le processus par lequel les cellules perçoivent leur environnement à travers les signaux solubles mais aussi physiques et mécaniques comme la rigidité de la matrice ou le confinement spatial. Elles sont capables de décrypter et de convertir ces stimuli présents dans la matrice extracellulaire en signaux biochimiques, induisant une modification du comportement cellulaire tels la croissance, la différenciation, la progression tumorale (Dupont et al. 2011).

La mécanosensation régule notamment l'activité de facteurs de transcription YAP (Yes-associated protein) et son co-facteur TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif). Ces derniers représentent des senseurs et des médiateurs nucléaires des signaux mécaniques exercés par le microenvironnement cellulaire. L'activité des YAP/TAZ est sensible à l'activité des RhoGTPases (essentiellement RhoA) et à la tension du cytosquelette d'actine exercée par la myosine II. En effet, en réponse à un étalement important des cellules, la cellule ajuste sa tension et réorganise son cytosquelette en formant d'importantes fibres de stress. La forte contractilité provoque la localisation nucléaire et par conséquent, l'activité de YAP/TAZ agissant comme facteurs de transcription. A l'inverse, YAP/TAZ sera séquestré dans le cytoplasme puis dégradé par le protéasome dans les cellules faiblement étalées. Ainsi, l'étalement des cellules souches mésenchymateuses sur des micro-patrons régule la différenciation par le biais de l'activité de YAP/TAZ. Dans le cas de la différenciation adipocytaire, elle est inhibée puisque cytoplasmique et à l'inverse, dans le cas de la différenciation en ostéoblaste, elle est nucléaire et active (Dupont et al. 2011).

En 2015, Kim et collaborateurs démontrent que la ciliogénèse induite par le confinement spatial est régulée par le programme transcriptionnel de YAP/TAZ (Figure 55) (J. Kim et al. 2015). La contrainte physique des cellules ou le traitement des cellules avec des agents déstabilisateurs du cytosquelette d'actine (cytochalasine D), conditions requises pour la formation du cil, promeut la rétention de YAP/TAZ dans le cytoplasme. A l'inverse, YAP/TAZ est nucléaire et actif lorsque les cellules sont fortement étalées sur le substrat. L'inhibition de YAP/TAZ augmente le potentiel ciliogénique même en absence de stimulation ciliogénique (comme la privation de sérum). A l'inverse, une hyper activation de YAP/TAZ supprime la ciliogénèse induite par la privation de sérum. Ainsi, il existe une interaction antagoniste entre la ciliogénèse et la fonction des YAP/TAZ en réponse à des signaux mécaniques comme la forme et la rigidité de la matrice.

Cependant, si le programme transcriptionnel induit par YAP/TAZ est impliqué négativement dans la croissance du cil, il ne semble pas être impliqué dans le processus de migration du corps basal : les cellules confinées sur-exprimant YAP/TAZ (mimant ainsi

l'étalement de la cellule sur grand micro-patron) n'ont pas de cil primaire mais présentent un corps basal au niveau de leur membrane apicale (J. Kim et al. 2015).

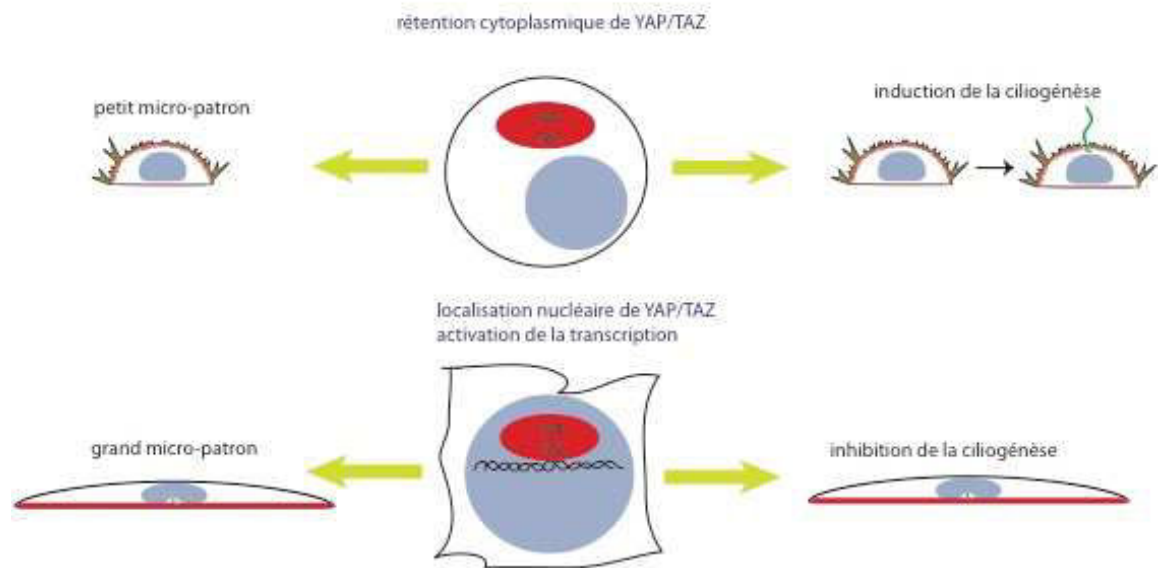


Figure 55 : YAP/TAZ agissant comme senseurs et médiateurs de signaux mécaniques issus du microenvironnement.

Le confinement spatial induit une rétention cytoplasmique du complexe YAP/TAZ. L'inactivation de ces facteurs de transcription favorise la ciliogénèse

A l'inverse, l'étalement de la cellule sur un micro-patron provoque une localisation nucléaire et une activation de YAP/TAZ. Ce processus inhibe la ciliogénèse. Figure inspirée du schéma de Piccolo et al. (2014).

Certaines protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine sont impliquées dans l'inactivation de YAP/TAZ dans les conditions de confinement spatial. C'est le cas de protéines dites de coiffe (ou capping) comme CapZ et la gelsoline et de protéines fragmentant l'actine comme la cofiline. L'inhibition de ces protéines dans les cellules ensemencées à haute densité augmente la présence de fibres de stress et active le complexe YAP/TAZ qui se trouve dans ce cas relocalisé dans le noyau. Ces données révèlent que l'activation de YAP/TAZ est contrôlé par l'architecture de l'actine, qui est elle même modulée par des régulateurs de l'organisation du cytosquelette (Aragona et al. 2013).

C. Rôle complexe du cytosquelette d'actine sur les deux étapes de la ciliogénèse : migration du centrosome et élongation du cil

Afin d'étudier le rôle du cytosquelette d'actine dans la migration du centrosome et dans la ciliogénèse 24h après le retrait du sérum, différents agents destabilisateurs des filaments d'actine ont été utilisés dans notre étude. A l'issue de l'addition de ces drogues, différents effets aussi bien sur la migration que sur l'élongation du cil ont peu être observés, révélant la complexité de la contribution de l'actine dans le processus ciliogénique. Les effets ont été schématisés dans la figure 56.

La dépolymérisation de l'actine induite par la cytochalasine D induit une augmentation de la longueur du cil dans les cellules confinées sur les petits disques. Dans le cas des cellules

étalées, la cytochalasine D a un effet remarquable à tous les niveaux : en plus de promouvoir le transport du corps basal (normalement localisé sous le noyau) à la surface dorsale, elle augmente d'un facteur 4 le pourcentage de cellules ciliées et la longueur du cil d'un facteur 2.

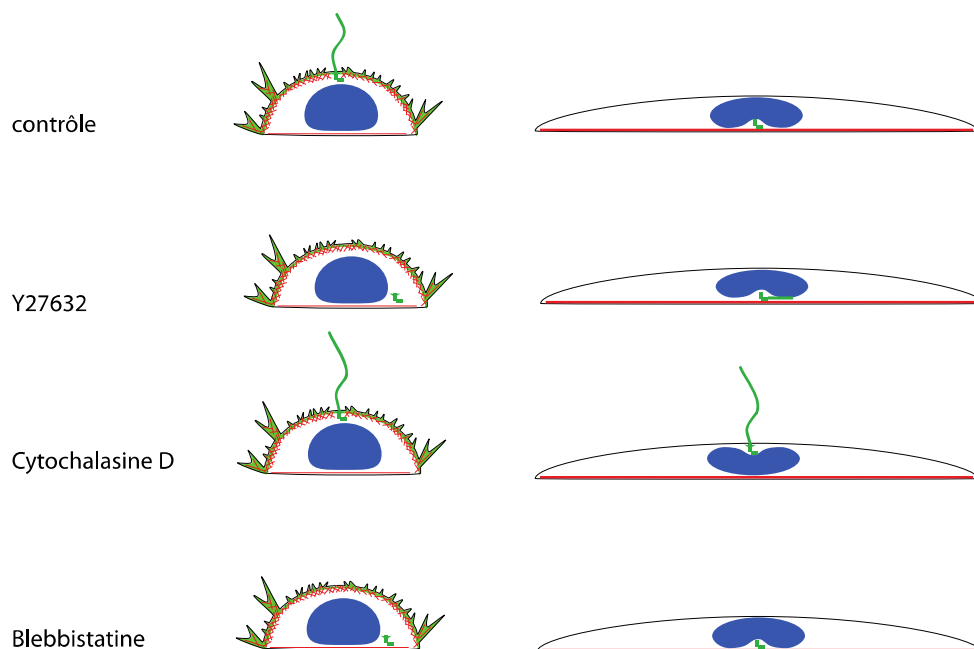


Figure 56 : Effet de drogues déstabilisant l'architecture d'actine ou la contractilité sur la migration et la croissance du cil primaire sur petit et grand micro-patron, 24h après retrait de sérum.

L'inhibition de la kinase Rho par le composé Y27632 provoque quasiment le même phénotype que la blebbistatine sur les cellules confinées : tous deux inhibent le mouvement du centrosome et diminue modérément la proportion de cellules ciliées. A l'inverse, sur les cellules étalées, les deux drogues augmentent l'élongation du cil, lequel était très court dans les cellules contrôles. Cependant, ces deux drogues ont des effets différents sur le positionnement du corps basal. Après le traitement avec Y2732, le corps basal est maintenu en position basale, tandis que la blebbistatine favorise la migration.

Tous ces phénotypes révèlent la complexité du rôle exercé par les différentes architectures d'actine sur la migration du corps basal et sur la propension des cellules à former un cil primaire. Le rôle de la cytochalasine D sur la ciliogénèse et sur la longueur du cil avait déjà été rapporté (Kim et al. 2010). Dans cette étude, nous démontrons que la cytochalasine D a pour effet de favoriser les deux étapes de la ciliogénèse (migration du corps basal et élongation du cil) quelque soit le confinement physique. Il a par ailleurs été démontré que la cytochalasine D induit la rétention de YAP/TAZ dans le cytoplasme, conditions requise pour la ciliogénèse notamment (J. Kim et al. 2015). En revanche, les phénotypes en réponse au traitement avec le Y27632 et la blebbistatine sont plus variés et sont dépendant de l'étalement de la cellule. Le spectre d'action de Y27632 est large et affecte un grand nombre d'effecteurs de Rho comme les protéines ERM, RhoA expliquant probablement la diversité des réponses cellulaires. La blebbistatine révèle le

rôle de la myosine II dans la migration du corps basal. De façon étonnante, une diminution de la contractilité des filaments d'actine présente dans les cellules confinées (déjà relativement faible) nuit au processus ciliogénique, alors que dans les cellules étalées, elle le favorise. Cela pourrait s'expliquer par l'existence de deux architectures d'actine exclusifs dans la cellule : le réseau branché présent à la membrane apicale et le réseau contractile sous forme de fibres de stress ventrales. Un juste équilibre entre contractilité basale et relaxation apicale permet le bon déroulement de toutes les phases de la ciliogénèse (Figure 57).

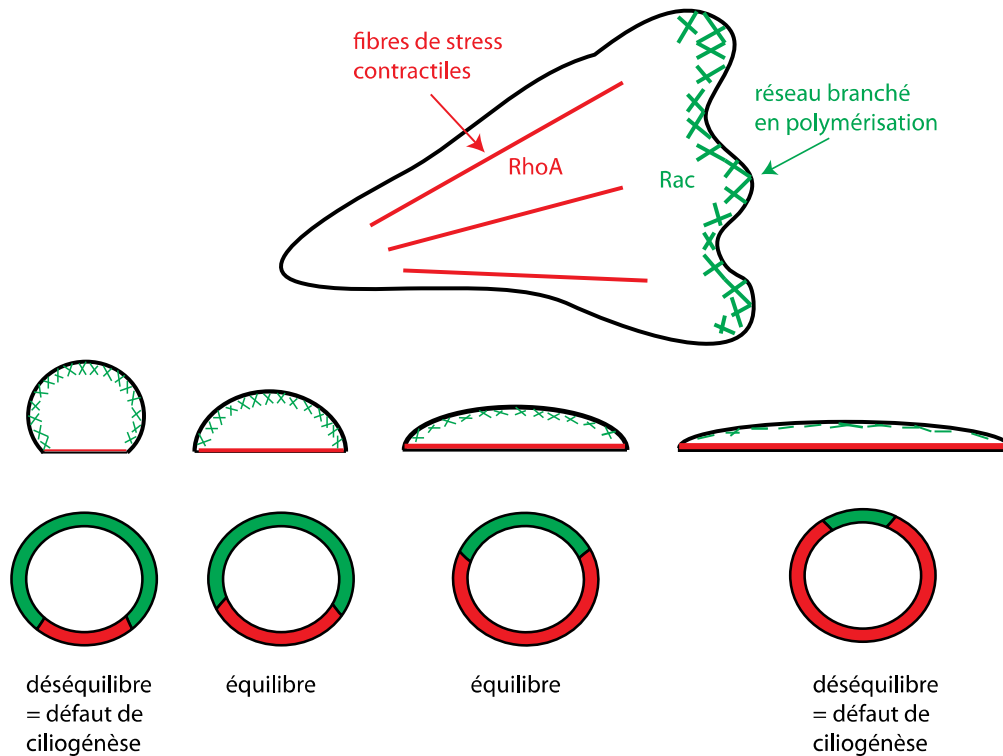


Figure 57 : La ciliogénèse nécessite une balance entre deux états exclusifs d'actine : le réseau branché présent au niveau de la membrane apicale (vert) et un réseau contractile au niveau de la membrane basale (rouge).

D. Polarisation d'une cellule unique dépourvue de contact cellule/cellule

La capacité d'une cellule RPE1 unique et privée de sérum sur micro-patron témoigne de l'importance de son interaction avec la matrice extracellulaire. Cela révèle également que dans ce type cellulaire, le rôle des contacts cellule/cellule semble négligeable. Quelques exemples montrent que l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire joue un rôle clé dans la génération de l'asymétrie de la membrane. Dans le cas des MDCK, leur attachement à la matrice induit une rapide localisation de protéines corticales à la membrane apicale, lesquelles sont même exclues de la membrane qui est en contact avec la matrice. (Yeaman et al. 1999). Par ailleurs, certains types cellulaires comme des cellules intestinales peuvent ségréger des protéines selon les domaines membranaires en absence de jonction cellulaire (Baas et al. 2004). De même, les cellules épithéliales de drosophile ne possèdent pas de jonctions serrées et pourtant sont capables de se polariser (McCaffrey & Macara 2012).

Au laboratoire, d'autres types cellulaires ont été testés comme les RPTEC/TERT (human renal proximal tubule epithelial cells) qui sont des cellules épithéliales du tubule proximal de rein ainsi que des cellules souches mésenchymateuses issues de biopsies de moelle osseuse. Ces deux types cellulaires parviennent également à former un cil lorsqu'elles sont seules sur un micro-patron recouvert de fibronectine. Cela témoigne du rôle prépondérant du contact cellule/matrice. D'autres lignées cellulaires telles que les MDCK et les MCF10A (cellules humaines épithéliales issues de glandes mammaires) ont également été testées mais formant des clusters, il est difficile des les isoler sur des micro-patrons.

E. Rôle du réseau de microtubules dans la ciliogénèse?

Dans cette étude, nous avons observé une augmentation du niveau d'acétylation des microtubules lorsque les cellules sont ensemencées sur des grands disques de 3000 μm^2 comparativement aux cellules confinées sur petits disques de 700 μm^2 . Ce phénomène a également été observé dans d'autres situations. Plusieurs études ont rapporté une hyperacétylation des microtubules dans des cellules rénales (*in vitro* et issues de kystes rénaux de patients atteints de ciliopathies) et de cellules de cornée (issues de souris mutantes) dépourvues de cil primaire, suite à une inhibition de l'expression de IFT88 ou de KIF3A (Loktev et al. 2008; Berbari et al. 2012). Ce processus provoque une stabilité accrue des microtubules au froid et serait par ailleurs la conséquence d'une activité élevée de l'acétyltransférase $\alpha\text{TAT1/MEC17}$ (Berbari et al. 2013). Dans le cas de notre étude où des cellules sont fortement étalées et contractées sur les grands disques, pourrait-on observer également une augmentation de $\alpha\text{TAT1/MEC17}$? Ces cellules sont-elles dans l'incapacité de déacétyler les microtubules? Le niveau d'activité de l'histone déacétylase HDAC6 est-il diminué?

A ce sujet, deux publications montrent que l'activité de HDAC6 est notamment régulée positivement par une protéine centrosomale Cep70 et négativement par CYLD, une déubiquitinase impliquée dans la ciliogénèse (Yang et al. 2014; Shi et al. 2015). L'ensemble de ces résultats témoigne d'une interaction entre le cil primaire/corps basal et le cytosquelette de microtubules via le rôle de certaines protéines dans la régulation de la stabilité des microtubules.

Hypothèse 1 : le corps basal peut être tiré en direction de la membrane apicale enrichie en protéines de polarité et en dynéine (Figure 59).

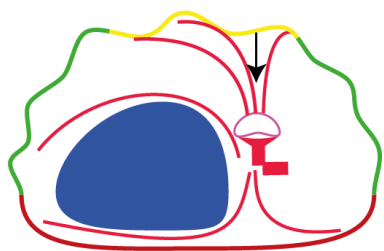


Figure 59 : Hypothèse 1 proposant une force de traction exercée par la dynéine localisée à la membrane apicale (segment jaune) sur le corps basal

Hypothèse 2 : le corps basal est déplacé vers la membrane apicale par une force de poussée exercée par les microtubules. Cette force de poussée peut être induite par une augmentation de longueur et/ou du nombre de microtubules. Le changement de longueur des microtubules peut être la conséquence d'un excès de polymérisation de microtubules ou d'une augmentation de stabilité. Pinot et collaborateurs montrent que la réduction d'une gouttelette lipidique dans lesquelles sont placés des asters de microtubules est à l'origine d'un décentrage de l'aster (Figure 60 A) (voir chapitre 3 partie forces de poussée et de traction). Nous nous sommes inspirés de ces résultats et avons envisagé que dans le cas inverse où le confinement reste identique mais le nombre et/ou la longueur des microtubules augmente, le décentrage serait également effectif (Figure 60 B).

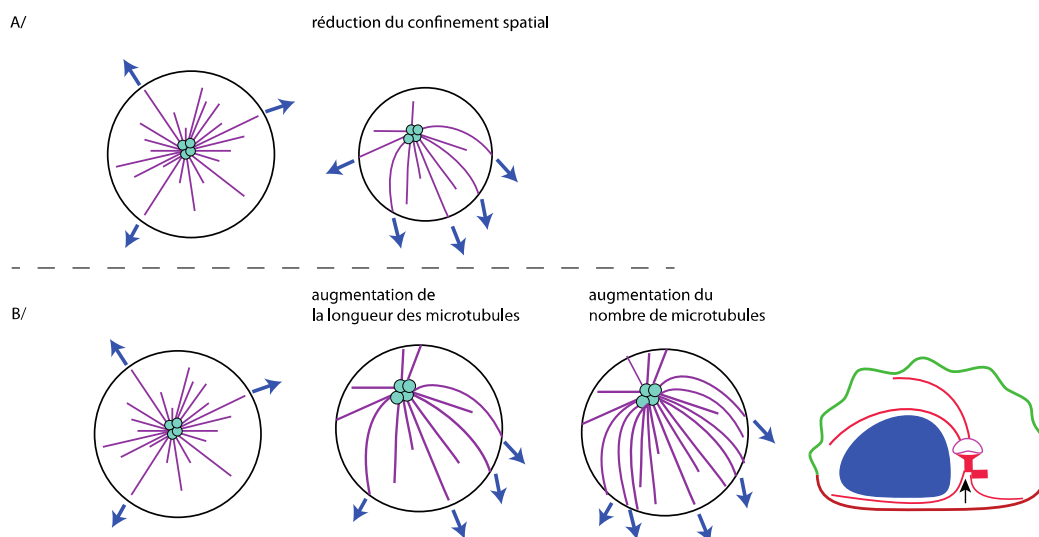


Figure 60 : Hypothèse 2: Effet de la longueur et/ou du nombre de microtubules sur le décentrage du centrosome.

Schéma de gauche

A/ D'après l'étude de Pinot et collaborateurs, l'aster de microtubules est poussé vers la périphérie de la gouttelette lorsque cette dernière devient moins volumineuse

B/ Hypothèse de travail : l'augmentation de la longueur et/ou du nombre de microtubules au sein d'une gouttelette de volume constant décentre l'aster de microtubules.

Schémas inspirés et tirés de Vignaud et al. (2012).

Schéma de droite : force de poussée exercée par les microtubules sur le corps basal afin de le transporter jusqu'à la membrane apicale.

Hypothèse 3 : La fonction de la vésicule est encore inconnue. Si celle-ci arborait des moteurs qui la déplacent le long des microtubules, elle pourrait servir de wagon pour le transport du corps basal vers la membrane apicale (Figure 61).

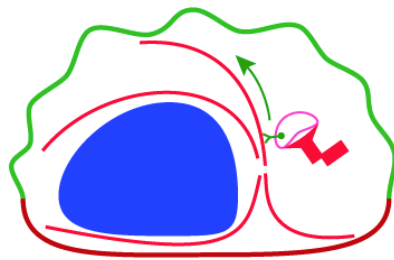


Figure 61 : Hypothèse 3 : La vésicule ciliaire associée à l'extrémité distale du corps basal pourrait se déplacer le long des microtubules grâce à l'action d'éventuels moteurs présents à la surface de la vésicule.

Si le cytosquelette est très certainement un acteur essentiel dans le déplacement du corps basal, il en est de même pour certains composants ciliaires probablement associés à ce cytosquelette. A ce jour, certaines protéines ciliaires, si elles sont déficientes, compromettent le transport du corps basal. C'est le cas de meckeline ou encore de MYH10 (Dawe et al. 2009; Hong et al. 2015). Notre système expérimental combiné à la technique d'ARN interférence convient pour l'identification de nouveaux gènes contribuant à la migration du corps basal. Pour ce faire, nous avons réalisé un mini-crible utilisant des siARN (small interfering RNA) ciblant des modulateurs positifs déjà connus de la ciliogénèse, à l'exception de l'émerine (Figure 63). L'objectif étant ici de caractériser la phase de la ciliogénèse défailante quand ces composants sont inhibés (selon la position du corps basal en z): la migration du corps basal ou l'élongation du cil primaire. Le protocole est illustré dans la figure 64.

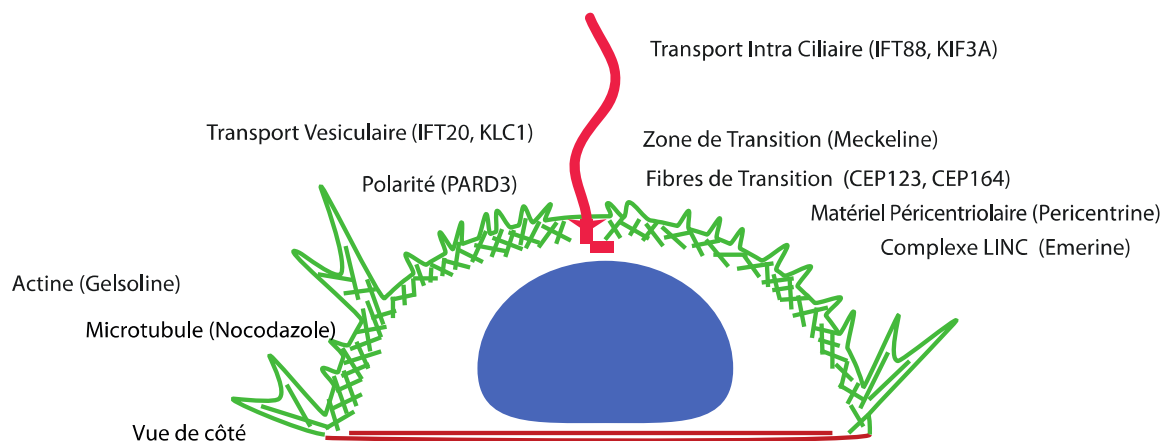


Figure 63 : Schéma illustrant les gènes ciblés par les siARNs lors du mini-crible visant à identifier des modulateurs de la ciliogénèse impliqués dans la migration du corps basal.

Publications faisant référence au rôle de chacun de ces composants ciliaires ciblés dans la ciliogénèse :

IFT88 (Gregory J Pazour et al. 2000)
Nesprine 2G (Dawe et al. 2009)
KIF3A (Lin et al. 2003)
Péricentrine (Jurczyk et al. 2004)
IFT20 (Follit et al. 2006)

CEP123 (Sillibourne et al. 2013)
Gelsoline (Kim et al. 2010)
PARD3 (Sfakianos et al. 2007)
CEP164 (Graser et al. 2007)
Meckeline (Dawe, Smith, et al. 2007)

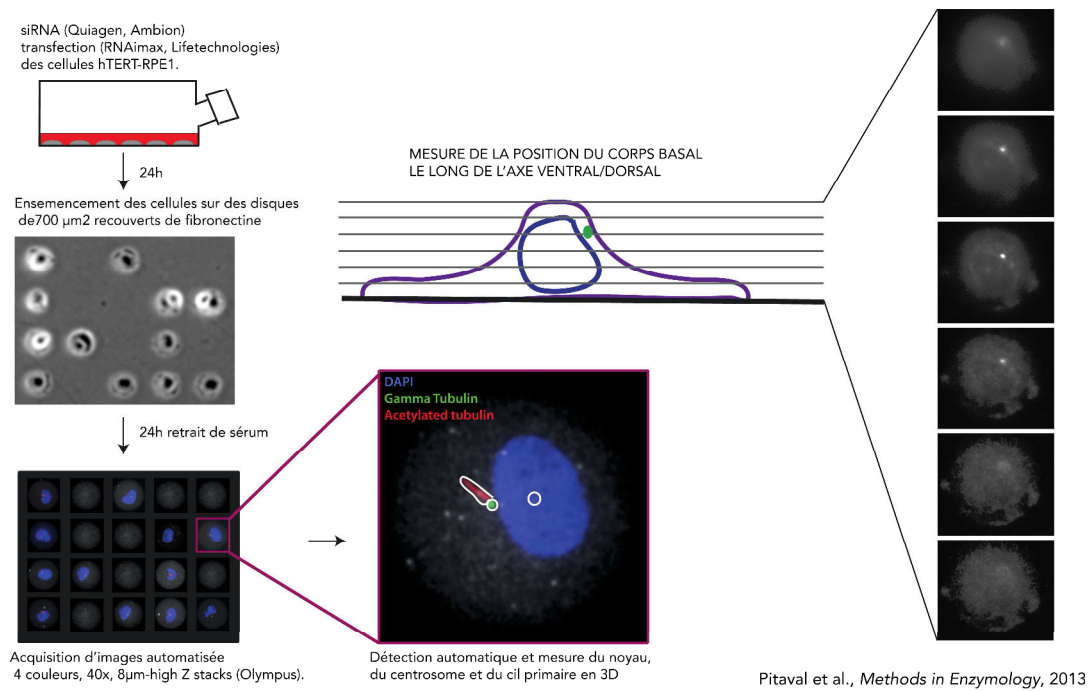


Figure 64 : Schéma représentant le protocole utilisé lors du mini-crible. Les cellules RPE1 ont été transfectées dans des plaques 6 puits à 10nM final pendant 24h. Après trypsinisation, les cellules transfectées ont été ensemencées sur des petits disques de 700 µm². Après étalement des cellules, le retrait de sérum a été effectué pendant 24h afin d'induire la ciliogénèse. La fixation puis le marquage du noyau, du cil primaire (tubuline acétylée) et du centrosome (tubuline gamma) ont été réalisées..

2. Article en préparation

Microtubule stabilization drives basal body migration to initiate primary ciliogenesis

Pitaval, A., Senger, F. Letort, G., Gidrol, X., Sillibourne, J., & Théry, M.

Prêt à être soumis

Microtubule stabilization drives basal body migration to initiate primary ciliogenesis

Amandine Pitaval^{1,2}, Fabrice Senger², Gaëlle Letort², Xavier Gidrol¹, James Sillibourne^{2,3}
& Manuel Théry^{2,3}

¹ Laboratoire BIOMICS,

Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, 38054 Grenoble, France

² Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, Institut National de la Recherche Agronomique, 38054 Grenoble, France

³ Unité de Thérapie Cellulaire, Unité de Recherche (U1160), Hôpital Saint Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010, Paris, France

Abstract

Primary cilia, cell surface sensory organelles, are assembled through the coordinated conversion of the mother centriole (MC) in the centrosome into a basal body (BB). Migration of the MC to the apical surface is a prerequisite for primary cilium formation, yet surprisingly little is known about this process. Here, we exploited the reproducibility of cell micro-patterning to investigate the mechanisms of BB migration. Dramatic remodeling of both the microtubule and actin cytoskeletons was required for BB migration, with disruption of either perturbing movement. The density and stability of microtubules surrounding the centrosome increased rapidly, within 2-4 hours, after the induction of primary ciliogenesis. Concomitant myosin II-dependent remodeling of the actin cytoskeleton, from a symmetrical to asymmetrical array, also occurred. Results of a candidate-based siRNA screen of known primary ciliogenesis effectors linked the distal appendage protein Cep164 to BB migration and cytoskeletal remodeling, both of which failed its absence. Together, our data demonstrate that the hitherto unexplored mechanism of BB migration during primary ciliogenesis is driven by a transient increase in microtubule stability and myosin II-dependent actin remodeling.

Introduction

Primary cilia are sensory organelles localized at the surface of most cells in the human body (Wheatley et al. 1996). They possess cell-type specific transmembrane receptors that respond to extracellular signals and transduce them to the interior of the cell. This function of primary cilia is important for cellular homeostasis and embryonic development, during which primary cilia have important instructive roles in tissue formation (Nigg & Raff 2009). Genetic mutations that result in the failure to form a primary cilium cause developmental defects including polydactyly, craniofacial defects and heart malformation, and highlight the crucial role of this organelle in development (Goetz & Anderson 2010).

The formation of a primary cilium occurs through the conversion of the centrosome's mother centriole to a basal body (Sorokin 1962). In non-polarized cells, this process can be broken down into four fundamental steps: 1) the formation of a ciliary vesicle at the distal end of the mother centriole; 2) extension of an axoneme from the plus ends of the mother centriole's centriolar microtubules; 3) migration of the mother centriole to the apical surface and; 4) attachment of the mother centriole to the cortex. In polarized cells a ciliary vesicle does not form, instead the basal body attaches directly to the cortex and an axoneme is extended. Primary cilium assembly is a complex and highly coordinated process, which is reflected by the large number of primary ciliogenesis effectors and their diverse functions (Kim et al. 2010; Wheway et al. 2015).

The initial step of primary ciliogenesis, ciliary vesicle formation, begins with Rab-dependent trafficking of vesicles to the distal appendages of the mother centriole (Knödler et al. 2010; Nachury et al. 2007; Westlake et al. 2011), to which they attach and eventually fuse (Lu et al. 2015) to create a larger ciliary vesicle covering the end of the centriole. Assembly of the ciliary vesicle is coordinated with the removal of an inhibitory capping complex from the distal end of the mother centriole. CP110 and Cep97 are two components of this complex (Spektor et al. 2007) and their displacement from the distal end of the mother centriole is mediated by the kinase TTBK2 (Goetz et al. 2012). Recent work has shown that Cep164, a distal appendage protein (Graser et al. 2007), plays an important role in both the anchoring of factors (Cajánek & Nigg 2014) regulating the

removal of the CP110 and Cep97-containing inhibitory complex and the formation of the primary ciliary vesicle (Schmidt et al. 2012).

Once the ciliary vesicle has begun to form, the ciliary axoneme is extended from the distal end of the mother centriole through the addition of tubulin to the plus ends of the centriolar microtubules. This is dependent upon the activity of a multi-subunit complex known as the intraflagellar transport (IFT) complex. Transport is dependent upon the activity of kinesin and dynein molecular motors, which interact with different subunits of the IFT complex (Lehtreck 2015).

Remodeling of the actin cytoskeleton is necessary for primary cilium formation to occur, and perturbation of the function of actin regulators is known to impede primary ciliogenesis (Pitaval et al. 2010). Branched actin filament formation is unfavorable for primary ciliogenesis because it impairs the recruitment of primary ciliogenesis effectors to a region surrounding the centrosome referred to as the pericentrosomal preciliary compartment (PPC) (Kim et al. 2010). Depletion of Arp2/3 complex subunits or a low dose of cytochalasin D, both of which disrupt actin filament formation, facilitates the formation of the PPC and promotes primary ciliogenesis. Moreover, cytochalasin D treatment can induce primary cilium formation in serum-fed cells and increase cilium length, indicating tight coupling between the actin cytoskeleton and primary ciliogenesis (Kim et al. 2010). Part of this effect may be due to a reduction in actomyosin contractility, as high contractility is known to decrease the frequency of primary cilium formation and cilium length (Pitaval et al. 2010).

The final steps of primary cilium formation in non-polarized cells are migration of the centrosome to the apical surface and attachment of the basal body to the cortex (Sorokin 1962). More is known about how the basal body is attached to the cortex than the apical migration of the centrosome, which remains an understudied process. Basal body attachment to the cortex is mediated by the mother centriole's distal appendages and several of their components have been identified. Cep83 is a key distal appendage protein (Joo et al. 2013) that is responsible for anchoring four other components, Cep89 (Cep123/CCDC123) (Sillibourne et al. 2013), SCLT1, Cep164 (Graser et al. 2007) and

FBF1 to this site (Tanos et al. 2013). Exactly how the basal body is anchored to the cortex or how it arrives at this site is not known.

In this paper, we exploited the reproducibility of adhesive cell micropatterning to investigate in detail the mechanisms driving apical centrosome migration during primary ciliogenesis. Dramatic remodeling of the actin and microtubule cytoskeletons was found to drive apical centrosome movement and relied on the activity of molecular motors. A candidate-based siRNA screen of primary ciliogenesis effectors identified a role for distal appendage proteins in centrosome movement. These data characterize in detail the previously understudied process of centrosome migration and identify unreported roles for known ciliogenesis effectors in this process.

Results

Basal body migration in micropatterned cells occurs in a spatially and temporally defined manner

Previous studies have shown that the culture of cells on adhesive micropatterns promotes reproducible organelle positioning and results in a defined intracellular architecture (Théry et al. 2006; Pitaval et al. 2013). We have shown that primary ciliogenesis can be induced in retinal pigment epithelial 1 (RPE1) cells cultured on disc-shaped micropatterns and is influenced by cell confinement and contractility (Pitaval et al. 2010). Highly confined cells exhibiting low contractility form primary cilia more frequently than less constrained cells exhibiting higher contractility. For this reason, we chose to monitor the BB migration step of primary ciliogenesis (Figure 1A) in RPE1 cells growing on small disc-shaped micropatterns with an area of 700 μm^2 because they exhibited low contractility. RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 were cultured either in the presence or absence of serum for 24 hours and were then fixed and stained with phalloidin to label F-actin and an antibody to acetylated tubulin to label cilia (Figure 1B). This revealed that the centrosome was located at the basal surface in cells cultured in the presence of serum, while those cultured in the absence of serum had formed cilia and the centrosome was at the apical surface. To determine the timing of BB migration, RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 were fixed and stained with an acetylated tubulin antibody at intervals over a 24-hour period. BB migration was found to occur rapidly, with the centrosome typically localizing to the apical surface 2-4 hours after serum starvation (Figure 1C). Quantification of the number of ciliated cells over time showed that only 20% of cells were ciliated after 4 hours of serum starvation, but this figure increased to nearly 80% after 24 hours (Figure 1C). Monitoring of BB migration by live imaging of RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 confirmed these results (Figure 1D). Together, these data demonstrated that BB migration was one of the initial steps of primary ciliogenesis, which occurred rapidly after serum starvation, and this process could be easily monitored and quantified in micropatterned cells.

Role of known ciliogenesis effectors in basal body migration

Next, we decided to investigate the role of known primary ciliogenesis effectors in basal body migration, using siRNA to mediate their depletion. Candidates were chosen to reflect the diversity of ciliogenesis effectors and included Cep164 (Graser et al. 2007), Cep123 (Cep89/CCDC123) (Sillibourne et al. 2013; Tanos et al. 2013), intraflagellar transport 20 (IFT20), partitioning defective 3 (PARD3) (Sfakianos et al. 2007), nesprin2G, emerin, meckelin (Dawe et al. 2009), pericentrin (Jurczyk et al. 2004), KIF3A (Lin et al. 2003), gelsolin (Kim et al. 2010), kinesin light chain (KLC1) and IFT88 (G J Pazour et al. 2000). Small-interfering RNA-mediated protein depletion was used to assess the role of each candidate in centrosome migration (Supplementary figure S1A). RPE1 cells previously treated with siRNA were plated onto micropatterns and the centrosome position determined relative to the micropattern after serum starvation for 24 hours (Figure 2A and Supplementary figure S1B). BB migration was impaired after the depletion of most of the candidates, with the exception of KLC1 and IFT88 where it occurred unhindered. Depletion of the tested candidates caused a decrease in the number of ciliated cells after 24 hours of serum starvation, confirming published results (Figure 2A).

Two candidates, Cep164 and IFT88, were selected for further analysis as their depletion (Supplementary figure S1C) resulted in opposing phenotypes, with depletion of Cep164 blocking BB migration and IFT88 ablation having no effect. Confocal imaging and oblique view reconstructions confirmed our initial results and showed that after serum starvation the centrosome was at the basal surface in Cep164-depleted cells, while in IFT88-depleted cells it was at the apical surface, but neither possessed a cilium, in contrast to control siRNA-treated cells (Figure 2B). These results indicated that some primary ciliogenesis effectors participate in BB migration while others, such as IFT88, do not.

Remodeling of the microtubule network during basal body migration

Centrosome positioning is known to be microtubule dependent. We decided to investigate the role of microtubules in basal body movement by treating cells with the

microtubule depolymerizing agent nocodazole. To determine if an intact microtubule network is required for basal body migration, cells were treated with nocodazole for 1 hour prior to serum starvation. Depolymerization of the microtubule network impaired basal body migration, with the mean z position of the centrosome, relative to the micropattern, being $3.1 \pm 1.3 \mu\text{m}$ in controls and $1.94 \pm 1.2 \mu\text{m}$ in nocodazole treated cells ($p=0.0003$). In concordance with impaired basal body migration, the number of ciliated cells was reduced from 63% in controls ($n=100$) to 31% in nocodazole-treated cells ($n=50$). These results indicated that an intact microtubule array was required for centrosome migration and primary cilium formation.

To investigate the role of microtubules in basal body migration in more detail live imaging of micropatterned RPE1 EGFP-centrin 1 cells transduced with MAP4-RFP, to label the microtubules (Figure 3A and B), was carried out. Imaging of cells cultured in the absence serum revealed that centrosome migration typically began 2 to 4 hours after serum starvation and this coincided with a dramatic increase in the number of microtubules surrounding the centrosome (Figure 3A). Where basal body migration did not occur, no increase in microtubule density surrounding the centrosome was observed (Figure 3B and Supplementary figure S1D). Changes in microtubule density were quantified by staining serum-starved, micropatterned RPE1 cells with an antibody to α -tubulin, and measuring microtubule fluorescence intensity in a $5 \mu\text{m}$ region surrounding the centrosome (Figure 3C). These measurements demonstrated that microtubule density around the centrosome increased with time after serum-starvation. Furthermore, when these measurements were plotted against the axial position of the centrosome there was a clear positive correlation between centrosome position and microtubule density (Figure 3D). Combined, these data suggest that centrosome migration is, in part, driven by an increase in the number of microtubules and the capacity of the centrosome to organize and interact with this microtubule network. To support such a model of basal body migration, serum-starved RPE1 cells were stained with an antibody to the microtubule end-binding protein EB1 and its fluorescent intensity was measured over time (Figure 3E). An increase in EB1 fluorescence intensity was observed 2 hours after serum starvation in concordance with the α -tubulin fluorescence intensity measurements and supported a role for increased microtubule nucleation in BB migration.

Role of stable microtubules in driving basal body motion

We reasoned that the apparent increase in microtubule density might be due to changes in microtubule dynamics, and a transient increase in microtubule stability. To test this, micropatterned RPE1 cells were serum-starved for 2 hours and then subjected to a brief cold shock before staining with an antibody to tubulin (Figure 4A). The results of this assay demonstrated that microtubule dynamics were indeed altered, as there was a transient increase in the number of cold-resistant microtubules 2 hours after serum starvation. These data indicated that increased microtubule stability could induce remodeling of the microtubule network and drive centrosome movement. We tested this hypothesis in numerical simulations of microtubule dynamics, changing the rate of microtubule catastrophe. A relatively low catastrophe rate was found to result in the formation of a microtubule network capable of driving centrosome movement to the apical surface (Figure 4B). Together, these results suggest that changes in microtubule dynamics either by stabilization or altered catastrophe rates enable apical centrosome migration.

Actin remodeling induces symmetry breaking and influences the microtubule network to promote apical motion of the basal body

While our results indicated that changes in microtubule stability and remodeling of the microtubule network were important for centrosome migration, the actin cytoskeleton is known to be involved in BB migration in some systems (Sandoz et al. 1988; Lemulloy et al. 1988). Staining of RPE1 cells with phalloidin, to label F-actin, and an antibody to tubulin to label the microtubules, showed that profound changes occurred in the actin and microtubule cytoskeletons following serum starvation (Figure 5A). Prior to serum starvation the actin cytoskeleton was organized in a symmetrical fashion, whereas after 4 hours of serum starvation actin filaments partitioned to one side of the cell and the cytoskeleton appeared asymmetrical. This impacted upon the microtubule cytoskeleton and microtubules were often aligned with the actin cytoskeleton and unequally distributed in the cell.

To ascertain if the observed actin remodeling was myosin II-dependent, RPE1 cells were

serum-starved for a period of 4 hours with samples being removed at 1-hour intervals and fixed and stained with a phospho-myosin antibody and phalloidin (Figure 5B). This showed that cells cultured in the presence of serum possessed a radially symmetrical actin cytoskeleton, whereas those cultured in the absence of serum for 4 hours had an asymmetrical actin cytoskeleton with prominent actin fibers spanning the cytoplasm. Averaging of phospho-myosin signal demonstrated that the level of phospho-myosin progressively increased with time, indicating that serum starvation triggered an increase in contractility (Figure 5C). These data suggested that myosin II activity was required for actin remodeling, but did not provide any evidence supporting a role for myosin II-dependent contractility in BB migration. To test this RPE1 cells were treated with the myosin II inhibitor blebbistatin (Firestone et al. 2012) and a cold-resistance assay carried out. A dramatic reduction in the number of cold-stable microtubules, compared with controls, after blebbistatin treatment indicated that myosin II-dependent contractility was involved in microtubule stabilization and participated to BB migration (Figure 5D). Supporting these results, increased phosphoERM staining was observed after serum starvation (Supplementary figure S2A) although this appeared to occur after microtubule and actin cytoskeleton remodeling. Recruitment of the dynein-interacting proteins p150 and NuMA to the apical cortex was also observed after serum starvation (Supplementary figure S2B-D), raising the possibility that the molecular motor dynein may be involved in microtubule remodeling and BB migration.

Investigation of the role of ciliogenesis effectors in basal body migration

The above data suggested that basal body movement was driven by changes in the actin and microtubule cytoskeletons and was dependent upon the activity of myosin II. Within this context, we decided to investigate in more detail the phenotypes resulting from the depletion of Cep164 and IFT88, because their ablation had opposing effects upon BB migration. In a microtubule cold-resistance assay, Cep164-depleted cells were found to have fewer cold-resistant microtubules compared with control or IFT88-depleted cells (Figure 6A-C). This suggested that the centrosome migration defect previously observed in Cep164-depleted cells was due to a failure to remodel and stabilize microtubules that facilitated BB migration. To determine if the actin cytoskeleton was altered in Cep164- or IFT88-depleted cells, phospho-myosin staining was carried out on RPE1 cells

cultured in the presence or absence of serum for 4 hours (Figure 6D). Reduced phospho-myosin staining was observed in Cep164-depleted cells compared with control or IFT88-depleted cells after serum starvation. The failure of Cep164-depleted cells to remodel their actin and microtubule cytoskeletons implicates Cep164 in these processes and suggests a novel function for the protein. In contrast, depletion of IFT88 affected neither remodeling of the actin and microtubule cytoskeletons nor movement of the centrosome to the apical surface and places IFT88 downstream of Cep164 in the ciliogenesis pathway.

Discussion

In this paper we have exploited the reproducibility of cell micropatterning to characterize in detail the previously poorly defined step of centrosome migration during primary ciliogenesis. Prior to primary ciliogenesis, the centrosome was located at the basal surface of the cell and its translocation to the apical surface was found to rely on the remodeling of both the actin and microtubule cytoskeletons. Our results, and those of others, demonstrate that an intimate connection between the actin and microtubule cytoskeletons mediates centrosome migration and primary cilium formation.

Centrosome migration was found to rely on the reorganization of the microtubule network and the assembly of cold-stable microtubules. These changes were required for the movement of the centrosome to the apical surface, but once the mother centriole had reached this site they were no longer required. Cold-resistant microtubule formation is known to rely on microtubule-associated proteins (MAPs) and members of the MAP6 are involved in this process (Lefèvre et al. 2013); however these are expressed in a tissue-specific manner. MAP4 is ubiquitously expressed and has been shown to localize to axoneme of the primary cilium, where it competes with septins for the binding to microtubules and negatively regulates cilium length (Ghossoub et al. 2013). Depletion of MAP4 from RPE1 cells has little impact on primary cilium formation, indicating that it is not essential for the process, but it is possible that MAP4 plays a role in the transient stabilization of microtubules and centrosome migration. A potential role for MAP4 in this process will require further investigation.

An alternative mechanism of microtubule stabilization might exist. Recent work in fission yeast has shown that upon entry into quiescence *S. pombe* assembles its microtubules into a single bundle that is attached to the spindle pole body, the yeast equivalent of the centrosome (Laporte et al. 2015). The assembly of this single microtubule bundle from the three to five bundles of microtubules that are normally present during interphase is Ase I and Mto I dependent. Interestingly, homologs of these proteins exist in humans and they are PRC1 and CDK5RAP2 (Cep215), respectively. PRC1 is a microtubule bundling protein that binds to the microtubules of the central spindle that forms in late mitosis (Mollinari et al. 2002), while CDK5RAP2 is a pericentriolar material protein (PCM) involved in the nucleation of microtubules and

stimulates the activity of the γ -tubulin ring complex (Y.-K. Choi et al. 2010). It would be interesting to determine if CDK5RAP2 participates in the increased nucleation of microtubules during BB migration and if PRC1 is involved in reorganizing the microtubule network during primary cilium formation.

Microtubule reorganization and stabilization was dependent on actomyosin driven contractility, as inhibition of myosin II with blebbistatin prevented the formation of cold-stable microtubules. Recent work has established a connection between Mec17, the enzyme responsible acetylating microtubules, and myosin IIB (Rao et al. 2014). Mec17 appears to control the expression of myosin IIB, which is up-regulated during primary ciliogenesis and is required for primary cilium formation. In contrast, levels of myosin IIA remain constant after the induction of primary ciliogenesis and this motor plays an inhibitory role in the process (Rao et al. 2014). Surprisingly, depletion of Cep164 resulted in a similar phenotype as myosin II inhibition, suggesting that Cep164 is somehow involved in regulating actin dynamics. Cep164's participation in this process will require further investigation. These results combined with our data suggest that complex feedback between the actin and microtubule cytoskeletons and the centrosome is required for the initiation of primary cilium formation.

Our findings contrast those of early studies investigating basal body migration in multiciliated cells, such as those lining the ependyma, oviduct and trachea (Sandoz et al. 1988; Lemullois et al. 1988). In the quail oviduct, basal body migration was found not to rely on the microtubule network, and instead was dependent upon the actin cytoskeleton. The dependency of basal bodies in multi-ciliated cells solely upon the actin cytoskeleton for migration might reflect a structural difference between individual basal bodies and the mother centriole, which remains attached to the daughter centriole when a primary cilium is formed. In this respect, it has been shown that the striated rootlets of multiciliated cell basal bodies contain both actin and myosin and, furthermore, these structures often appear to be absent from primary cilia.

Altogether, our data demonstrate that centrosome migration to the apical surface is orchestrated by coordinated changes in the actin and microtubule cytoskeletons with an increase in microtubule stability playing an important part in the process. Identifying

the factors responsible for mediating microtubule stability and the connection with the actin cytoskeleton will be the next step and cell micropatterning will be invaluable in achieving this.

Materials and Methods

Cell Culture

Human telomerase-immortalized retinal pigment epithelial 1 (RPE1) cells (Clontech) and RPE1 cells stably expressing EGFP-centrin1 (a kind gift of Alexey Khodjakov) or Lifeact-GFP were cultured in a humidified incubator at 37°C in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (all from Life Technologies).

Micropatterns

Disc-shaped micropatterned coverslips were obtained from CYTOO or produced in house according to previously established protocols (Azioune et al. 2009).

Inhibitors

RPE1 cells were treated with 1 μ M cytochalasin D (Sigma), 1 μ M nocodazole (Sigma), 50 μ M ciliobrevin D (EMDMillipore). Synchronization of RPE1 cells by double thymidine block was carried out by culturing cells in medium containing 2 mM thymidine (Sigma) for 16 hours, removing the thymidine and culturing for 10 hours, and culturing again with 2 mM thymidine for a further 16 hours. Cells were released from the block by removing the thymidine and allowed to re-enter the cell cycle.

Viral transduction

RPE1 cells were transduced with BacMam MAP4-RFP virus (Life Technologies) according to the protocol provided.

Small-interfering RNA treatment

RPE1 cells were transfected with siRNAs (Qiagen and Dharmacon) using Lipofectamine RNAi Max transfection reagent (Life Technologies) at a final concentration of 10 nM following the manufacturer's protocol. At least two independent siRNAs were tested for each target with the exception of KLC where only a single siRNA duplex was used to deplete the protein from cells.

Antibodies and cytoskeletal labeling agents

Primary antibodies used in this study were obtained from the following sources and used at the following dilutions: mouse anti-acetylated tubulin (Sigma clone 6-11B-1; 1/10,000 for IF), rabbit anti-alpha tubulin (Serotec AbD MCA77G; 1/3,000 for IF), rabbit anti-Cep164 (Erich Nigg; 1/1,000 for IF and 1:2,000 for WB), mouse anti-EB1 (BD Biosciences #610535; 1/500 for IF), rabbit anti-gamma-tubulin (Abcam ab11317; 1/1,000 for IF), rabbit anti-GAPDH (Santa Cruz #25778; 1/200 for WB), rabbit anti-IFT88 (Proteintech #13967; 1/50 for IF and 1/200 for WB), mouse anti-lamin A/C (Sigma, clone 4C11; 1/5,000 for WB), rabbit anti-NuMA (Santa Cruz #48773; 1/100 for IF), mouse anti-p150glued (BD Biosciences #612709; 1/100 for IF), anti-pERM (Cell Signaling Technology #3141; 1/800 for IF), and rabbit anti-phospho myosin light chain 2 (Ser19) (Cell Signaling Technology #3671; 1/50 for IF). Alexa fluorophore-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) were diluted 1/1,000. Alexa fluorophore-conjugated phalloidin (Molecular Probes) was re-suspended in methanol and diluted 1/500 in PBS.

Immunofluorescent staining

Cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 15 minutes at ambient temperature and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 5 minutes. After washing with PBS the cells were blocked with PBSAT (PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma) and 0.1% Triton X-100) for 15 minutes. The cells were stained with primary antibodies diluted in PBSAT for 1 hour, followed by extensive washing with PBSAT and staining with secondary antibodies diluted in PBSAT for 30 minutes. The cells were washed with PBS and the DNA labeled with 0.2 µg/ml DAPI (Sigma) for 1 minute. After washing the cells with water, the coverslips were air-dried and mounted onto slides using Mowiol.

Live and fixed cell imaging

Live cell imaging was carried out on a Nikon spinning disk microscope equipped with a 60X, 1.4 NA objective lens and a HQ² CoolSnap camera. Images of fixed cells were captured on an Olympus BX61 microscope equipped with a 100X, 1.4 NA objective lens and a HQ² CoolSnap camera.

Western Blotting

Proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane using a semi-dry Western blotting apparatus (BioRad). The membranes were blocked with PBS containing 5% non-fat milk for 1 hour at ambient temperature. After blocking the membranes were probed with primary antibodies overnight at 4°C. The membranes were washed four times with blocking buffer before adding HRP-conjugated secondary antibodies (Life Technologies), diluted as recommended in blocking buffer, and incubating for 30 minutes at ambient temperature. After washing three times with PBS containing 0.1% Tween-20 (Sigma) the membranes were developed using ECL reagent (Life Technologies) and imaged on the ChemiDoc system (BioRad).

Acknowledgements

We thank Alexey Khodjakov for the kind gift of RPE EGFP-centrin1 cells and Erich Nigg for anti-Cep164 antibody.

References

- Azioune, A., M. Storch, M. Bornens, M. Théry, and M. Piel. 2009. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab Chip*. 9:1640. doi:10.1039/b821581m.
- Cajánek, L., and E. a Nigg. 2014. Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:E2841–50. doi:10.1073/pnas.1401777111.
- Choi, Y.-K., P. Liu, S.K. Sze, C. Dai, and R.Z. Qi. 2010. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex. *J. Cell Biol.* 191:1089–1095. doi:10.1083/jcb.201007030.
- Dawe, H.R., M. Adams, G. Wheway, K. Szymanska, C. V Logan, A. a Noegel, K. Gull, and C. a Johnson. 2009. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 122:2716–2726. doi:10.1242/jcs.043794.
- Firestone, A.J., J.S. Weinger, M. Maldonado, K. Barlan, L.D. Langston, M. O'Donnell, V.I. Gelfand, T.M. Kapoor, and J.K. Chen. 2012. Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. *Nature*. 484:125–129. doi:10.1038/nature10936.
- Ghossoub, R., Q. Hu, M. Failer, M.-C. Rouyez, B. Spitzbarth, S. Mostowy, U. Wolfrum, S. Saunier, P. Cossart, W. Jamesnelson, and A. Benmerah. 2013. Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J. Cell Sci.* 126:2583–94. doi:10.1242/jcs.111377.
- Goetz, S.C., and K. V. Anderson. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 11:331–344. doi:10.1038/nrg2774.
- Goetz, S.C., K.F. Liem, and K.V. Anderson. 2012. The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis. *Cell*. 151:847–858. doi:10.1016/j.cell.2012.10.010.
- Graser, S., Y.-D. Stierhof, S.B. Lavoie, O.S. Gassner, S. Lamla, M. Le Clech, and E.A. Nigg. 2007. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* 179:321–30. doi:10.1083/jcb.200707181.
- Joo, K., C.G. Kim, M.-S. Lee, H.-Y. Moon, S.-H. Lee, M.J. Kim, H.-S. Kweon, W.-Y. Park, C.-H. Kim, J.G. Gleeson, and J. Kim. 2013. CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole. *Proc Natl Acad Sci.* 110:5987–92. doi:10.1073/pnas.1220927110.

- Jurczyk, A., A. Gromley, S. Redick, J. San Agustin, G. Witman, G.J. Pazour, D.J.M. Peters, and S. Doxsey. 2004. Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J. Cell Biol.* 166:637–43. doi:10.1083/jcb.200405023.
- Kim, J., J.E. Lee, S. Heynen-Genel, E. Suyama, K. Ono, K. Lee, T. Ideker, P. Aza-Blanc, and J.G. Gleeson. 2010. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature.* 464:1048–1051. doi:10.1038/nature08895.
- Knödler, A., S. Feng, J. Zhang, X. Zhang, A. Das, J. Peränen, and W. Guo. 2010. Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:6346–6351. doi:10.1073/pnas.1002401107.
- Laporte, D., F. Courtout, B. Pinson, J. Dompierre, B. Salin, L. Brocard, and I. Sagot. 2015. A stable microtubule array drives fission yeast polarity reestablishment upon quiescence exit. *J. Cell Biol.* 210. doi:10.1083/jcb.201502025.
- Lehtreck, K.F. 2015. IFT-Cargo Interactions and Protein Transport in Cilia. *Trends Biochem. Sci.* xx:1–14. doi:10.1016/j.tibs.2015.09.003.
- Lefèvre, J., P. Savarin, P. Gans, L. Hamon, M.J. Clément, M.O. David, C. Bosc, A. Andrieux, and P. a. Curmi. 2013. Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 288:24910–24922. doi:10.1074/jbc.M113.457267.
- Lemullois, M., E. Boisvieux-Ulrich, M.C. Laine, B. Chailley, and D. Sandoz. 1988. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol. Cell.* 63:195–208.
- Lin, F., T. Hiesberger, K. Cordes, A.M. Sinclair, L.S.B. Goldstein, S. Somlo, and P. Igarashi. 2003. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5286–5291. doi:10.1073/pnas.0836980100.
- Lu, Q., C. Insinna, C. Ott, J. Stauffer, P. a. Pintado, J. Rahajeng, U. Baxa, V. Walia, A. Cuenca, Y.-S. Hwang, I.O. Daar, S. Lopes, J. Lippincott-Schwartz, P.K. Jackson, S. Caplan, and C.J. Westlake. 2015. Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb3109.
- Mollinari, C., J.-P.P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, and R.L. Margolis. 2002. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol.* 157:1175–1186. doi:10.1083/jcb.200111052.

- Nachury, M. V., A. V. Loktev, Q. Zhang, C.J. Westlake, J. Peränen, A. Merdes, D.C. Slusarski, R.H. Scheller, J.F. Bazan, V.C. Sheffield, and P.K. Jackson. 2007. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*. 129:1201–1213. doi:10.1016/j.cell.2007.03.053.
- Nigg, E. a., and J.W. Raff. 2009. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell*. 139:663–678. doi:10.1016/j.cell.2009.10.036.
- Pazour, G.J., B.L. Dickert, Y. Vucica, E.S. Seeley, J.L. Rosenbaum, G.B. Witman, and D.G. Cole. 2000. Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 151:709–18. doi:10.1083/jcb.151.3.709.
- Pitaval, A., A. Christ, A. Curtet, Q. Tseng, and M. Théry. 2013. Probing Ciliogenesis Using Micropatterned Substrates. 525:109–130. doi:10.1016/B978-0-12-397944-5.00006-7.
- Pitaval, A., Q. Tseng, M. Bornens, and M. Théry. 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J. Cell Biol.* 191:303–312. doi:10.1083/jcb.201004003.
- Rao, Y., R. Hao, B. Wang, and T.-P. Yao. 2014. A Mec17-Myosin II Effector Axis Coordinates Microtubule Acetylation and Actin Dynamics to Control Primary Cilium Biogenesis. *PLoS One*. 9:e114087. doi:10.1371/journal.pone.0114087.
- Sandoz, D., B. Chailley, E. Boisvieux-Ulrich, M. Lemullois, M.C. Laine, and G. Bautista-Harris. 1988. Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biol. Cell*. 63:183–193. doi:http://dx.doi.org/.
- Schmidt, K.N., S. Kuhns, A. Neuner, B. Hub, H. Zentgraf, and G. Pereira. 2012. Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J. Cell Biol.* 199:1083–1101. doi:10.1083/jcb.201202126.
- Sfakianos, J., A. Togawa, S. Maday, M. Hull, M. Pypaert, L. Cantley, D. Toomre, and I. Mellman. 2007. Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 179:1133–1140. doi:10.1083/jcb.200709111.
- Sillibourne, J.E., I. Hurbain, T. Grand-Perret, B. Goud, P. Tran, and M. Bornens. 2013. Primary ciliogenesis requires the distal appendage component Cep123. *Biol. Open*. 2:535–45. doi:10.1242/bio.20134457.
- Sorokin, S. 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15:363–77.

- Spektor, A., W.Y. Tsang, D. Khoo, and B.D. Dynlacht. 2007. Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program. *Cell*. 130:678–690. doi:10.1016/j.cell.2007.06.027.
- Tanos, B.E., H.J. Yang, R. Soni, W.J. Wang, F.P. Macaluso, J.M. Asara, and M.F.B. Tsou. 2013. Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* 27:163–168. doi:10.1101/gad.207043.112.
- Théry, M., V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita, and M. Bornens. 2006. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:19771–6. doi:10.1073/pnas.0609267103.
- Westlake, C.J., L.M. Baye, M. V Nachury, K.J. Wright, K.E. Ervin, L. Phu, C. Chalouni, J.S. Beck, D.S. Kirkpatrick, D.C. Slusarski, V.C. Sheffield, R.H. Scheller, and P.K. Jackson. 2011. Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:2759–64. doi:10.1073/pnas.1018823108.
- Wheatley, D.N., a M. Wang, and G.E. Strugnell. 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol. Int.* 20:73–81. doi:10.1006/cbir.1996.0011.
- Wheway, G., M. Schmidts, D. a. Mans, K. Szymanska, T.-M.T. Nguyen, H. Racher, I.G. Phelps, G. Toedt, J. Kennedy, K. a. Wunderlich, N. Soroush, Z. a. Abdelhamed, S. Natarajan, W. Herridge, J. van Reeuwijk, N. Horn, K. Boldt, D. a. Parry, S.J.F. Letteboer, S. Roosing, M. Adams, S.M. Bell, J. Bond, J. Higgins, E.E. Morrison, D.C. Tomlinson, G.G. Slaats, T.J.P. van Dam, L. Huang, K. Kessler, A. Giessl, C. V. Logan, E. a. Boyle, J. Shendure, S. Anazi, M. Aldahmesh, S. Al Hazzaa, R. a. Hegele, C. Ober, P. Frosk, A. a. Mhanni, B.N. Chodirker, A.E. Chudley, R. Lamont, F.P. Bernier, C.L. Beaulieu, P. Gordon, R.T. Pon, C. Donahue, A.J. Barkovich, L. Wolf, C. Toomes, C.T. Thiel, K.M. Boycott, M. McKibbin, C.F. Inglehearn, F. Stewart, H. Omran, M. a. Huynen, P.I. Sergouniotis, F.S. Alkuraya, J.S. Parboosingh, a. M. Innes, C.E. Willoughby, R.H. Giles, A.R. Webster, M. Ueffing, O. Blacque, J.G. Gleeson, U. Wolfrum, P.L. Beales, T. Gibson, D. Doherty, H.M. Mitchison, R. Roepman, and C. a. Johnson. 2015. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb3201.

Figure Legends

Figure 1. Micropatterns facilitate the study of the early steps of primary ciliogenesis

A) A schematic depicting the steps of primary ciliogenesis. Current models propose that primary cilium formation begins with the assembly of a ciliary vesicle at the distal end of the mother centriole, after which the mother centriole (basal body) migrates to the apical surface and attaches to the cortex. Axoneme extension occurs once the basal body has anchored to the cortex. B) Micropatterned RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (white), cultured in the presence or absence of serum for 24 hours, stained with phalloidin (green), to visualize F-actin, acetylated tubulin antibody (red) to label the cilium and DAPI to stain the DNA (blue). When cells were cultured in the presence of serum, the centrosome was at the basal surface, while in the absence of serum the cells were ciliated and the basal body localized to the apical surface. C) Plotting the centrosome's Z position, as a percentage of nuclear height, showed that basal body migration to the apical surface began rapidly, with movement beginning 2 hours after serum starvation and being completed in most cells 8 hours after serum starvation. Basal body movement occurred prior to basal body migration as the number of ciliated cells increased over time and reached a maximum 24 hours after serum starvation (one experiment, n=60 cells per condition). D) Time lapse imaging of serum-starved RPE1 EGFP-centrin1 cells on micropatterns revealed the dynamics of basal body migration, which typically began 2 to 4 hours after serum starvation. Scale bars 5 μ m in all cases.

Figure 2. Evaluation of the role of known ciliogenesis effectors in basal body migration

A) Measurement of the centrosome's position, relative to the micropattern, in cells treated with siRNAs targeting factors known to be involved in primary cilium formation revealed that many were involved in basal body migration (left chart). Quantification of the number of ciliated cells confirmed published results and demonstrated that the candidates were required for primary cilium formation (right graph). Impaired basal body migration was observed after siRNA-mediated depletion of Cep123, Cep164, intraflagellar transport 20 (IFT20), partitioning defective 3 (PARD3), nesprin2G, emerin, meckelin, pericentrin (PCTN), Kif3A and gelsolin. In contrast, ablation of kinesin light chain (KLC) had no significant effect on basal body migration and loss of intraflagellar

transport 88 (IFT88) enhanced basal body migration compared to the control. B) Confocal imaging of serum-starved RPE1 EGFP-centrin1 (green) cells stained with DAPI to label the DNA (blue) and an antibody to α -tubulin (red) to stain microtubules showed that Cep164 depletion impaired basal body movement and the centrosome remained at the basal surface. In contrast, IFT88 depletion had no effect upon basal body migration and the centrosome was located at the apical surface of the cell. Staining of micropatterned RPE1 cells with antibodies to acetylated tubulin (red) and γ -tubulin (green) demonstrated that control cells were indeed ciliated after 24 hours of serum starvation, whereas Cep164- and IFT88-depleted cells were not.

Figure 3 Primary ciliogenesis induces changes in the microtubule network that drive basal body migration

A and B) Time lapse imaging of RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (red) and MAP4-RFP (green) was carried out to study microtubule dynamics during basal body migration. Two examples are shown, one where basal body migration was observed (A) and another where no migration was observed (B). In each case orthogonal reconstructions are shown in the top row and XY views in the bottom row. A) Basal body migration coincided with the formation of a dense microtubule network that surrounded the centrosome and along which it appeared to migrate. B) When basal body migration failed to occur no increase in microtubule density was observed. C) Measurement of the centrosome's Z position confirmed previous results and showed that basal body migration begins 2 hours after serum starvation. Basal body migration coincided with an increase in α -tubulin fluorescent intensity (green) in a 5 μ m box surrounding the centrosome in serum-starved RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (red) (n=75 cells per condition). D) Plotting of α -tubulin fluorescence intensity against centrosome's Z position, relative to the micropattern, supported a positive correlation between the Z position of the centrosome and microtubule density. E) Staining of serum-starved RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (green) with an antibody to EB1 (red), followed by fluorescence intensity measurements, supported the above findings and indicated that changes in the microtubule network were responsible for driving basal body movement to the apical surface (n=60 cells per condition). Scale bars XY, 10 μ m and Z, 5 μ m in all cases.

Figure 4 Characterization of microtubule remodeling in cells undergoing primary ciliogenesis

A) RPE1 cells were serum starved for 2 hours and then subjected to a cold shock, by placing on ice for 30 minutes. Staining of the cells with an antibody to α -tubulin (fire LUT) showed that there were more cold-stable microtubules in serum-starved cells compared with serum-fed cells. Quantification of α -tubulin fluorescence intensity demonstrated that there was a transient increase in the number of cold-stable microtubules 1 to 2 hours after the removal of serum and the induction of primary ciliogenesis (results of 3 independent experiments, n=125 cells per condition). B) A model of microtubule dynamics showing how changes in the catastrophe rate influence the axial position of the centrosome in the cell.

Figure 5 Actin remodeling induces symmetry breaking and influences the microtubule network to promote apical motion of the basal body

A) RPE1 cells expressing Lifeact-GFP (green) were cultured in the presence or absence of serum for 2 hours, fixed, and stained with an antibody to α -tubulin (red) to label the actin and microtubule cytoskeletons, respectively. The actin cytoskeleton in serum-fed cells appeared to be symmetrical, whereas in serum-starved cells the actin cytoskeleton was asymmetrical with actin fibers displaced to one side of the cell. Changes in the actin cytoskeleton influenced the microtubule network, with bundles of microtubules co-partitioning with displaced actin filaments. B) RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (grey) growing either in the presence or absence of serum were stained with phalloidin (green) to label the F-actin, phospho-myosin (red) and DAPI to label the DNA (blue). Induction of primary ciliogenesis by serum starvation resulted the formation of an asymmetrical actin cytoskeleton and provoked an increase in phospho-myosin levels, suggesting that increased myosin contractility was responsible for driving changes in the actin cytoskeleton. C) Staining of serum-starved RPE1 cells cultured on micropatterns with an antibody to phospho-myosin (fire LUT), followed by cell averaging, demonstrated that there was an increase in the amount of phosphorylated myosin and contractility upon serum starvation. D) Analysis of the position of the centrosome in serum-starved RPE1 cells expressing Lifeact-GFP (Fire LUT) treated with blebbistatin. Inhibition of contractility impaired the movement of the centrosome to the apical surface, indicating that a transient increase in contractility is part of the

mechanism driving the apical movement of the centrosome during primary ciliogenesis (results of 2 independent experiments, n=110 cells per condition).

Figure 6 Investigation of the role of ciliogenesis effectors in basal body migration

A and B) Short-interfering RNA-treated RPE1 cells were cultured on micropatterns in the presence or absence of serum for 2 hours, subjected to cold-shock for 30 minutes, fixed and stained with an antibody to α -tubulin (fire LUT). A) Depletion of Cep164 from cells impaired the formation of cold-stable microtubules after serum starvation. B) In contrast, depletion of IFT88 had little impact upon the formation of cold-stable microtubules. C) Quantification of α -tubulin levels in a 5 μ m square region surrounding the centrosome showed that after Cep164 depletion fewer cold-stable microtubules were present compared to the IFT88 or control siRNA-treated cells (results of 2 independent experiments, n=110 cells per condition). D) The effect of depleting Cep164 or IFT88 upon contractility was investigated by staining RPE1 cells with an antibody to phospho-myosin (fire LUT). Depletion of Cep164 dramatically reduced the amount of phospho-myosin after 4 hours of serum starvation compared to control or IFT88 siRNA-treated cells.

Supplementary Material

Cytoskeletal remodeling drives basal body migration to initiate primary ciliogenesis

Amandine Pitaval¹, Gaëlle Letort², Xavier Gidrol¹, James Sillibourne^{2,3} & Manuel Théry^{2,3}

¹ Laboratoire BIOMICS,
Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Direction des Sciences
du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, 38054
Grenoble, France

² Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Sciences et
Technologies pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies
Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier,
Institut National de la Recherche Agronomique, 38054 Grenoble, France

³ Unité de Thérapie Cellulaire, Unité de Recherche (U1160), Hôpital Saint Louis, 1
Avenue Claude Vellefaux, 75010, Paris, France

Supplementary Figures

Figure S1. Short-interfering RNA sequences and confirmation of their efficacy.

A) The sequences used in the candidate-based siRNA screen. B) Raw data of the results obtained from the siRNA screen that are presented in Figure 2A. C) Western blots demonstrating the efficacy of the Cep164 and IFT88 siRNAs. Lamin A/C or GAPDH antibodies were used as loading controls for the blots. D) Confocal imaging of RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (red) and stained with an antibody to α -tubulin (green) revealed that the centrosome was at the basal surface of the cell prior to serum starvation and moved to the apical surface between 2 to 4 hours after the removal of serum.

Figure S2 Recruitment of cytoskeletal regulators to the apical surface and dynein-interacting proteins to the centrosome.

A) Averaging of pERM fluorescence intensity in RPE1 cells cultured either in the presence or absence of serum demonstrated that pERM levels increased dramatically after serum starvation. B) Measurement of p150 fluorescence intensity at the centrosome in RPE1 EGFP-centrin1 cells showed that there was an increase in the amount of p150 at the centrosome (results of 2 independent experiments, n=100 cells per condition). This occurred after 4 hours of serum starvation, suggesting that it was downstream BB migration in the primary ciliogenesis pathway. C) The recruitment of NuMA to the apical surface of RPE1 cells after serum removal was monitored over time by measuring NuMA fluorescence intensity (results of 2 independent experiments, n=100 cells per condition). NuMA levels increased significantly 4 hours after serum removal and followed similar kinetics as p150. D) Images of RPE1 cells expressing EGFP-centrin1 (green), cultured in the presence or absence of serum, stained with antibodies to p150 (grey) and NuMA (red).

Figure 1

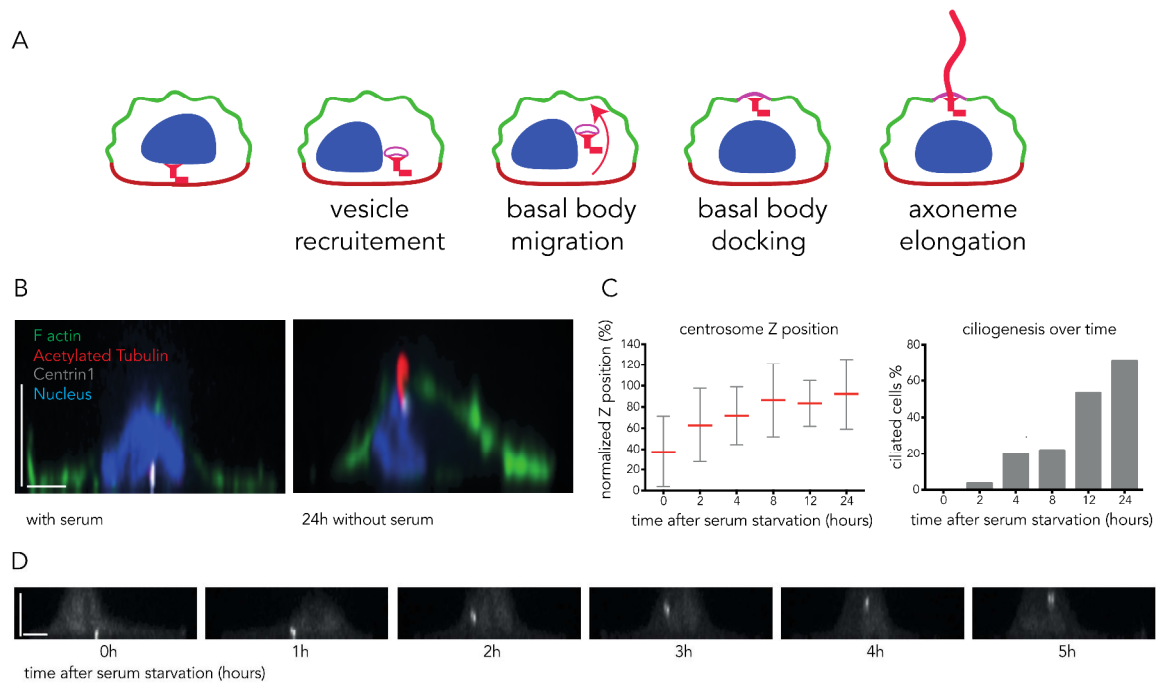


Figure 2

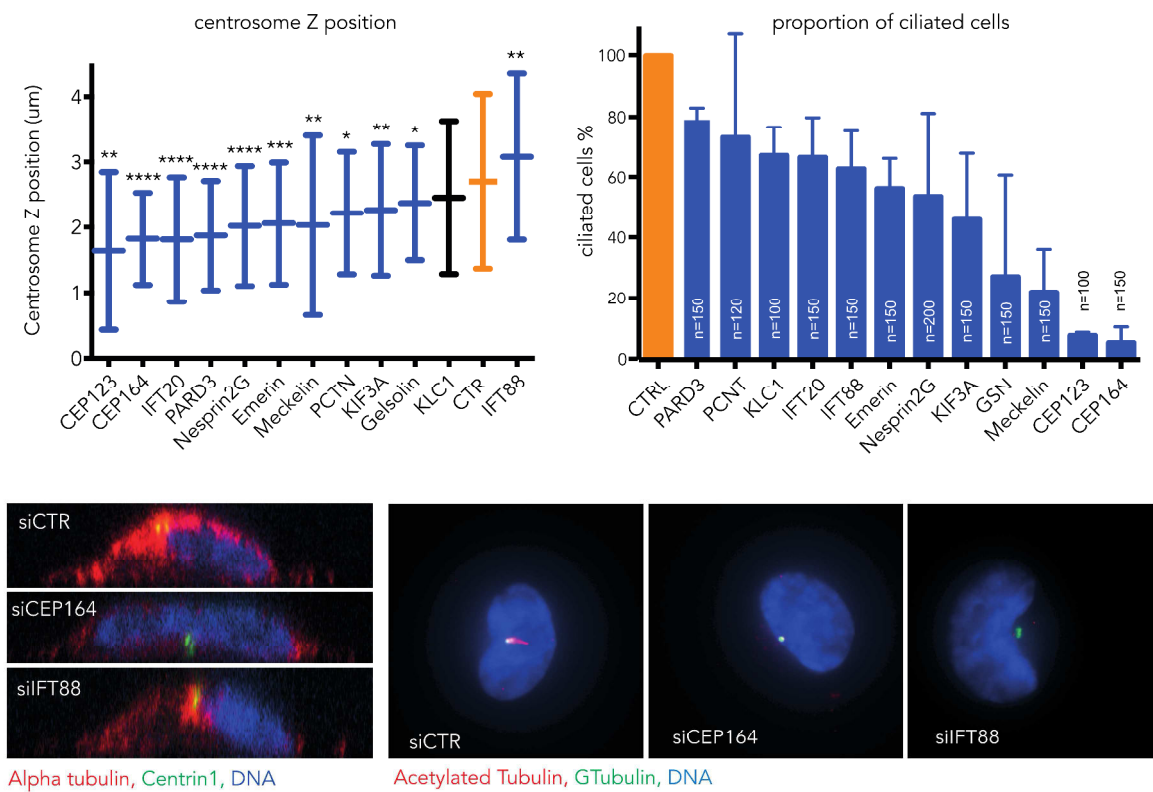


Figure 3

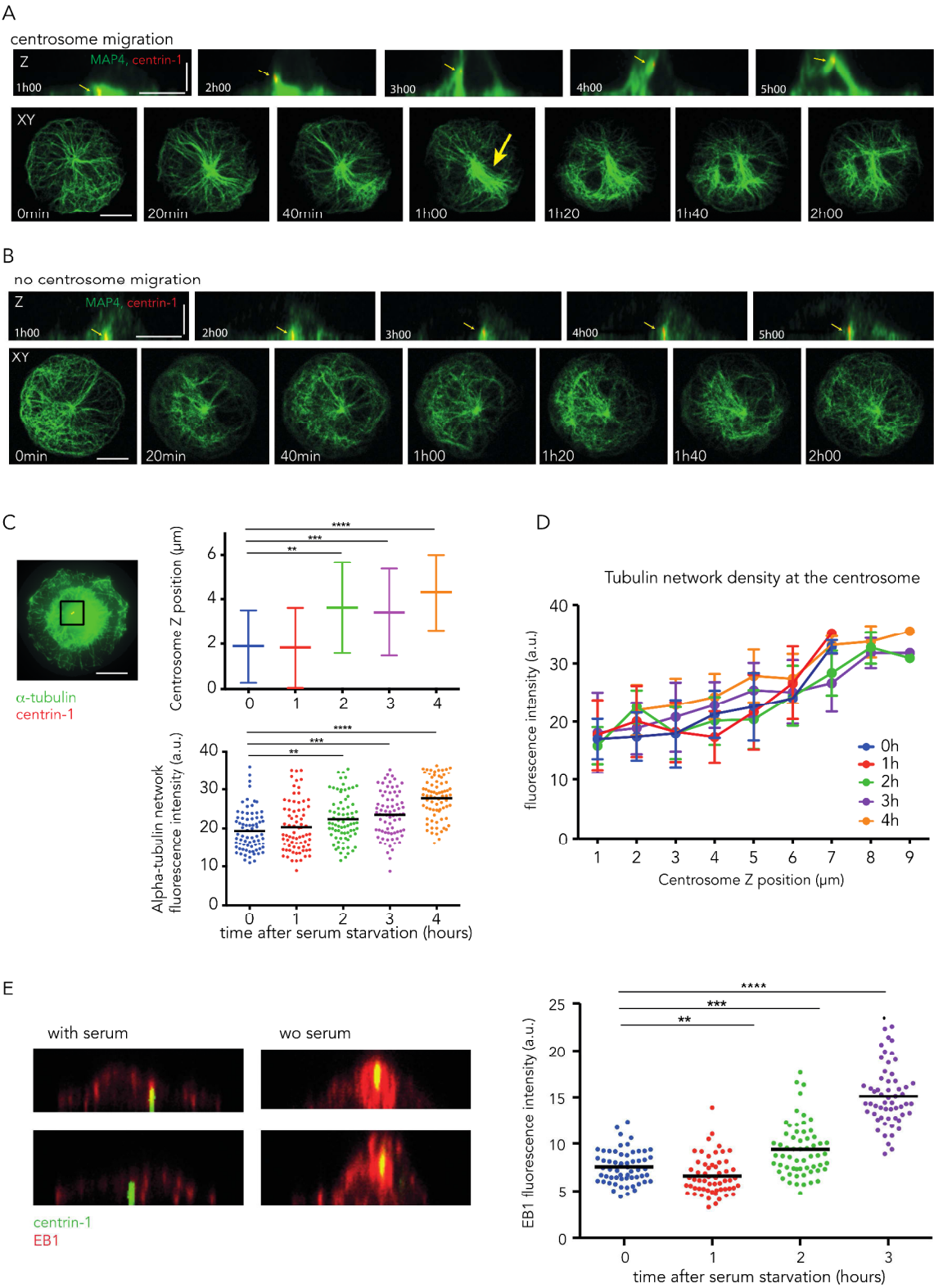
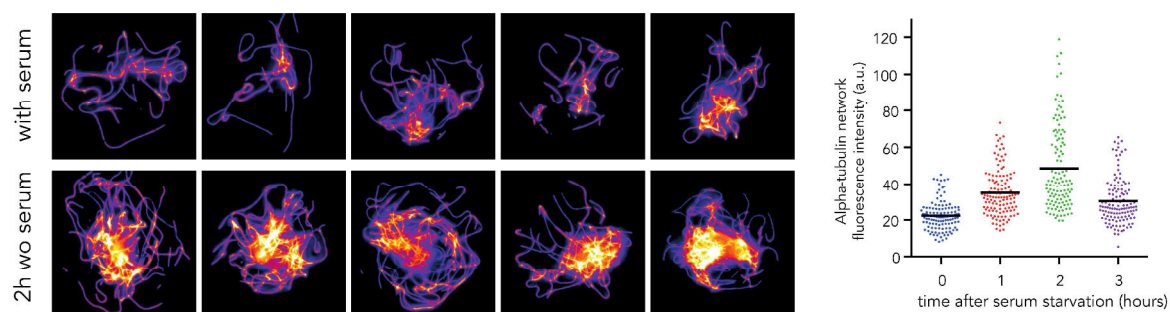


Figure 4

A



B

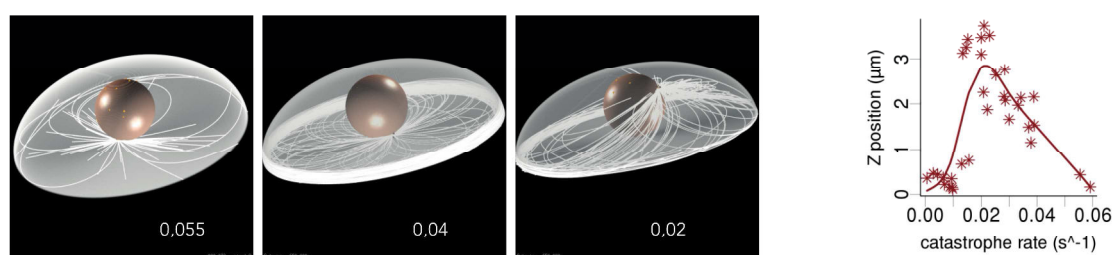


Figure 5

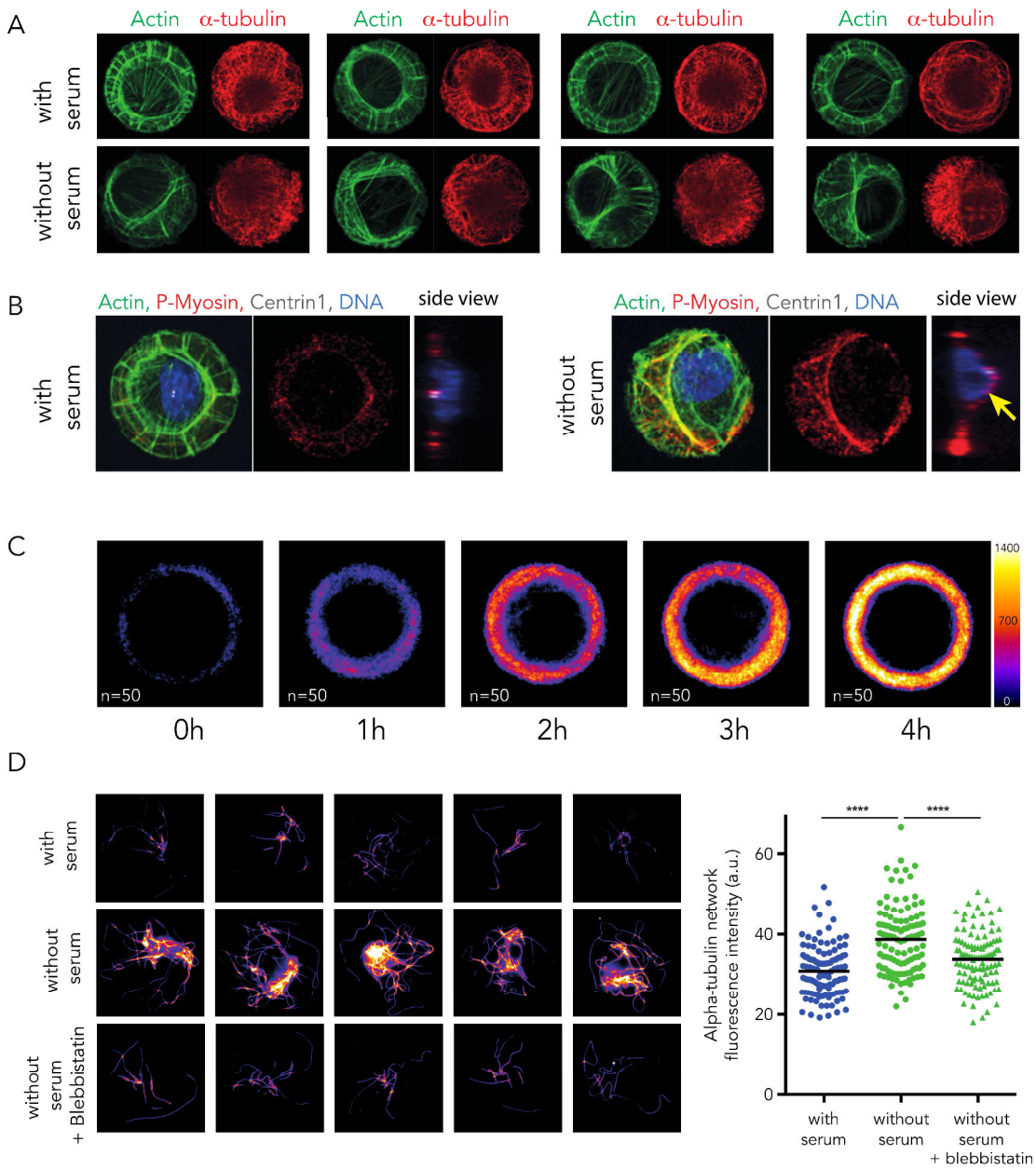


Figure 6

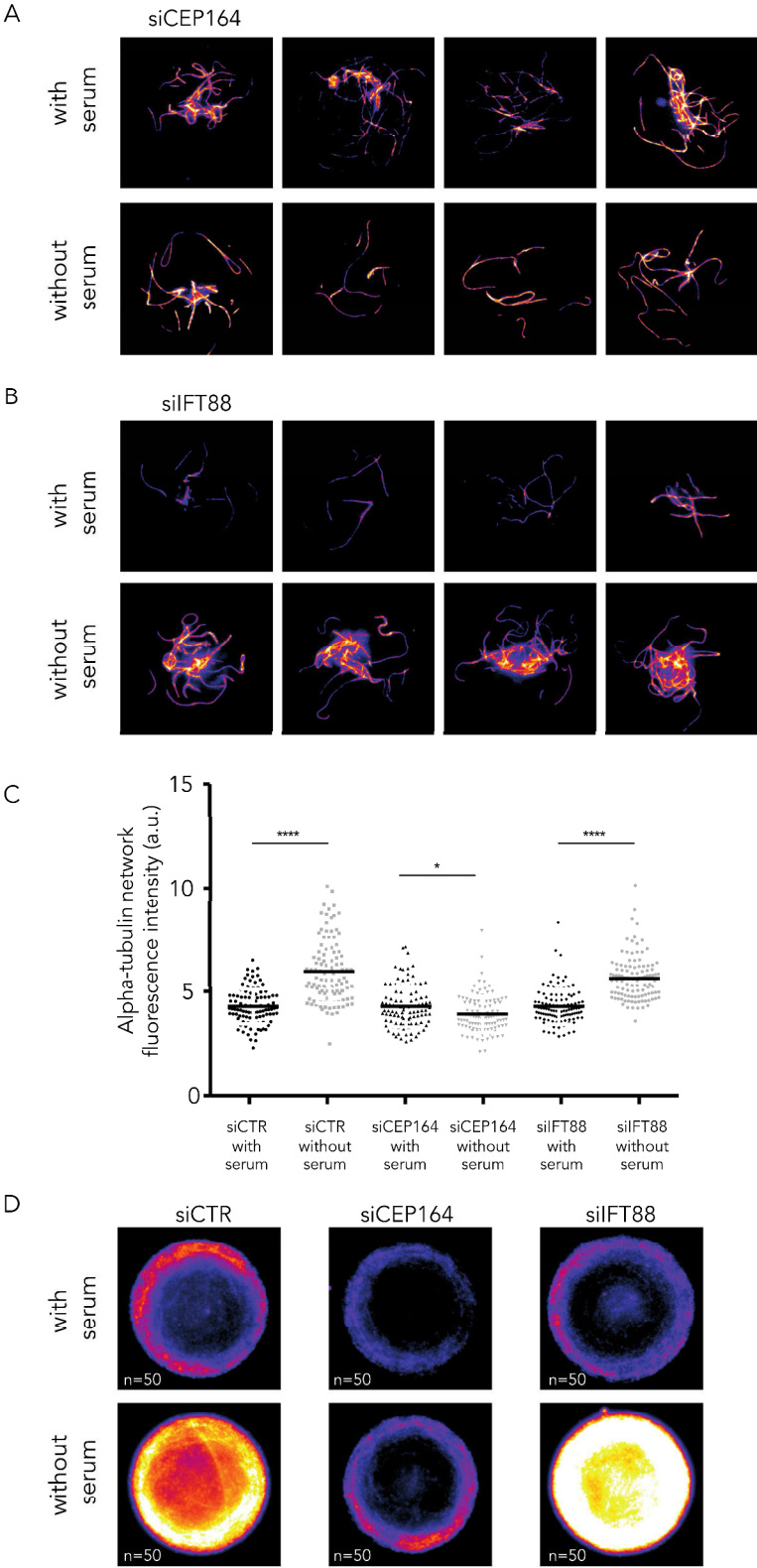


Figure S1

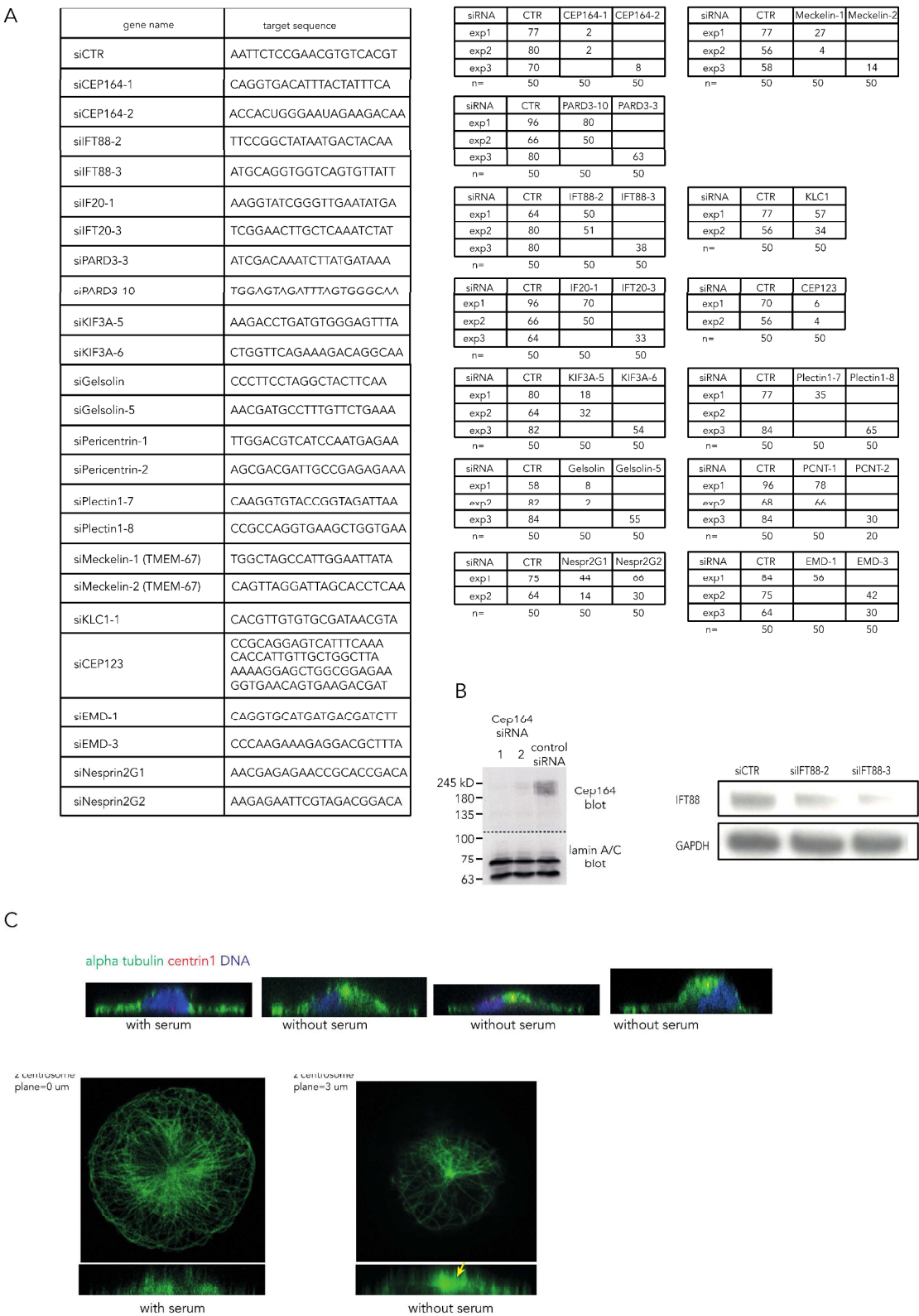
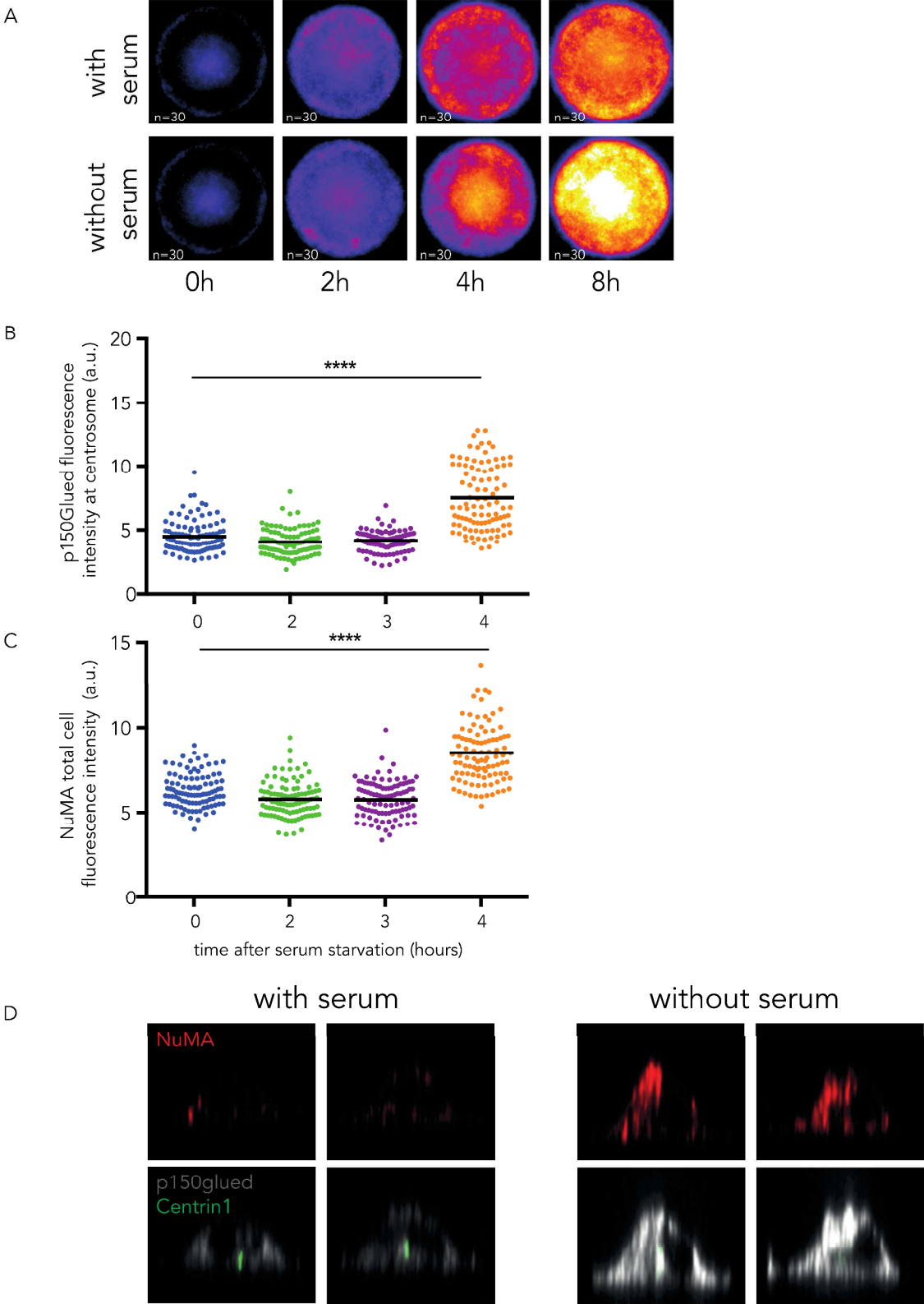


Figure S2



3. Conclusions générales

Ce travail a permis de mettre en évidence :

- **Figure 1** : la migration du corps basal jusqu'à la membrane apicale a lieu entre 1h et 4h après retrait de sérum pour une majorité des cellules. La moitié des cellules sont ciliées après 8h de sevrage indiquant que la phase d'élongation du cil prend place après le transport du corps basal à la membrane.

- **Figure 2** : un crible basé sur l'ARN interférence a permis d'identifier des gènes - déjà connus pour être des modulateurs positifs de la ciliogénèse (à l'exception de Emerine) - pour leur contribution dans le contrôle du mouvement du corps basal. Dans un premier temps, nous avons confirmé que leur inhibition de tous les gènes testés affecte la formation du cil (plus ou moins fortement selon les siARN testés et les gènes ciblés). De plus, l'inhibition de 10 gènes induit un défaut de migration du corps basal (plus ou moins fort selon les cas). Cep164 est l'un des candidats les plus intéressants pour notre étude. En effet sa déplétion entraîne de façon cumulée une absence du cil primaire dans 95% des cellules et une inhibition très marquée du mouvement du corps basal.

- **Figure 3** : la migration du corps basal est associée à une réorganisation drastique du réseau de microtubules. Au moment même où le corps basal quitte la membrane basale, une densification du réseau de microtubules au niveau de cette membrane basale est observée. A l'inverse, celle-ci fait défaut lorsque le corps basal reste en position basse. Cet événement a pu être constaté sur des cellules vivantes après transduction de MAP4 RFP (une protéine associée aux microtubules). Sur cellules fixées non transduites, la migration du corps basal en z est accompagnée d'une augmentation de l'intensité moyenne de la tubuline alpha ainsi que de EB1. Ces données suggèrent plusieurs hypothèses : un changement de dynamique des microtubules, une augmentation de nucléation, de nombre ou encore de longueur de microtubules émanant du corps basal.

- **Figure 4** : figure phare de notre étude : Les microtubules deviennent plus stables uniquement 2h après le retrait de sérum comparativement aux cellules non sevrées. La stabilité des microtubules peut être due à un taux de catastrophes plus faible, rendant les microtubules plus longs. Une simulation numérique révèle que la diminution des taux de catastrophe (donc une augmentation de la longueur des microtubules) serait la cause (ou une des causes) de la montée du corps basal à la surface dorsale. Les microtubules exerceraient ainsi une force de poussée sur le corps basal.

- **Figure S2** : des forces de traction pourraient intervenir (voir les quantifications de NuMA et les images de p150^{glued}), cependant, elles interviendraient plus tardivement, vers 4h après le retrait de sérum.

- **Figure 5** : le remodelage du réseau de microtubules est associé à une réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'à une brisure de symétrie dans l'organisation des deux réseaux. La contractilité des filaments d'actine induite par la myosine II phosphorylée augmente de façon croissante de 0h à 4h (échelle de temps observée). D'importants arcs transverses décorés de myosine II phosphorylée traversent la cellule. Ces deux réseaux de cytosquelette sont en constante interaction et dialogue continu comme le révèlent leur colocalisation en périphérie et l'effet de l'inhibition de la contractilité par la blebbistatine sur la stabilité des microtubules à 2h.

- **Figure 6** : L'inhibition de Cep164 induit un défaut à la fois de stabilité des microtubules et de contractilité des filaments d'actine. A l'inverse, les cellules déficientes en IFT88 (pas de défaut de

migration du corps basal) ne montrent pas de défaut de stabilité des microtubules ni de défaut de contractilité. Ces résultats témoigneraient du rôle de Cep164 dans l'organisation du cytosquelette.

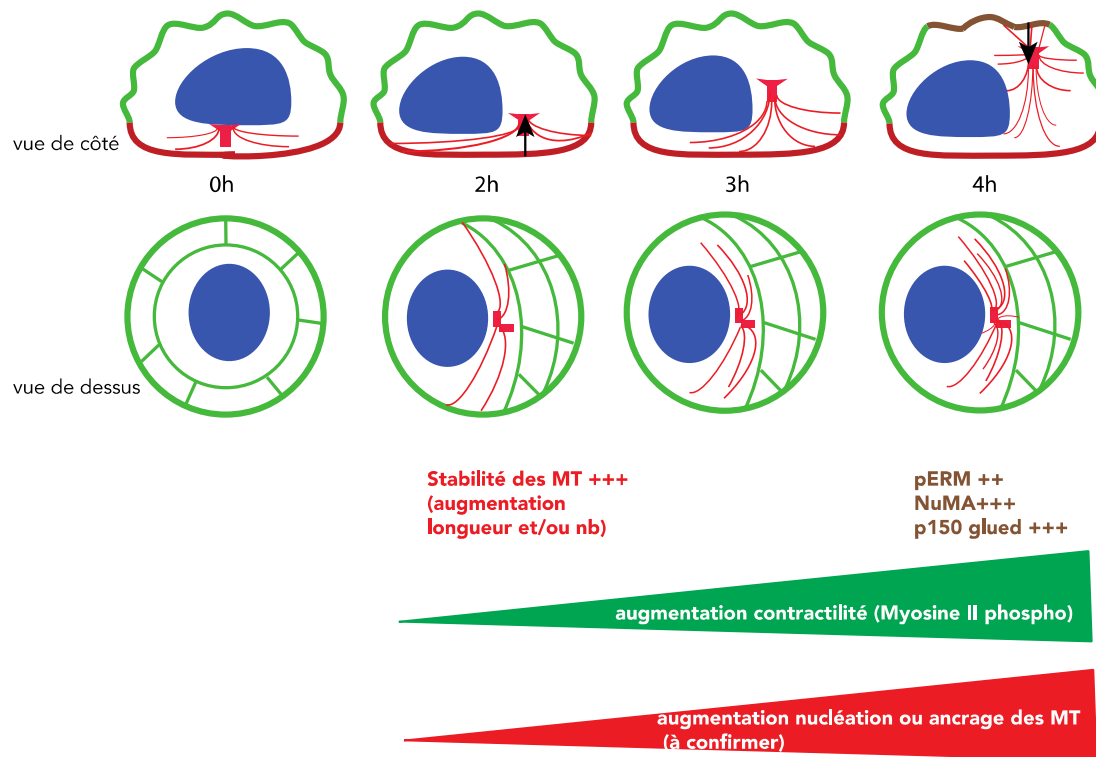


Figure 64 : Schéma résumant les observations et analyses tendant à démontrer le rôle de la stabilisation des microtubules et de la contractilité dans la migration du corps basal dans les premières heures de la ciliogénèse des RPE1.

En vert : filaments d'actine

En rouge : les microtubules (pour des soucis de clarté, je n'ai représenté que certains microtubules émanant du centrosome).

Certaines conclusions comme l'augmentation de la nucléation ou ancrage des microtubules sont à confirmer avec des expériences supplémentaires. Les flèches noires indiquent les forces de poussée ou de traction sur le corps basal (MT=microtubule).

4. Discussions et perspectives

Contrairement à la première publication parue dans Journal of Cell Biology, les expériences dans cette étude se sont révélées être beaucoup plus délicates, en terme de technique et en terme d'interprétation. Cela provient en grande partie du fait que dans cette étude, nous nous sommes intéressés à des événements dynamiques sur un temps court (0-4h après sevrage). Cela implique donc des réponses cellulaires variables, associées à des changements de réponses phénotypiques, certes reproductibles mais subtiles. En effet, les cellules pouvant être dans toutes les phases du cycle cellulaire, l'effet de la privation de sérum sur l'arrêt de cycle n'avait donc pas le même effet selon si la cellule était déjà en G1 ou si la cellule était en phase S avant le sevrage. Une synchronisation des cellules avec la thymidine

aurait été nécessaire afin que les cellules s'engagent toutes dans l'arrêt de cycle au même moment de leur cycle et de limiter ainsi la variabilité cellulaire. Cependant, aux vues du nombre important d'expériences à réaliser, des contraintes horaires et de l'augmentation de la durée de l'expérience de 20h, nous avons fait le choix de travailler avec les RPE1 non synchronisées,

A. Migration du corps basal et réorganisation du réseau de microtubules

L'implication du réseau de microtubules dans le mouvement du corps basal vers la membrane apicale a représenté une grande partie de mon travail. L'aspect novateur de ces recherches nous a incité à explorer les causes et les conséquences de ce remodelage lors des premières phases de la ciliogénèse, encore peu décrites à ce jour.

Le « pilier » de microtubules

L'important remodelage du réseau de microtubules concomitant avec la montée des centrioles lors des premières heures de la ciliogénèse a été observé fortuitement. Cette expérience a été à l'origine de toutes les recherches menées sur le réseau de microtubules. Elle fait suite au marquage des microtubules grâce à la transduction de MAP4-RFP (une protéine associée aux microtubules) des cellules RPE1 surexprimant la centrine-GFP. Des acquisitions d'images des cellules seules confinées sur des petits disques ont été effectuées toutes les 20 min après la privation de sérum. Une vue orthogonale de la cellule marquée (ou vue sur le côté) m'a permis de distinguer très nettement la présence d'une sorte de « pilier » ou de densification de microtubules autour des centrioles. Ce pilier apparaissait rapidement après le retrait de sérum et se formait depuis la surface basale et montait en direction de la surface apicale en même temps que les deux centrioles. Ce phénomène se produisait de façon systématique lorsque les centrioles se dirigeaient vers la membrane apicale. En revanche, ce pilier était absent lorsque les centrioles restaient en position basale. Par ailleurs, la présence de microtubules regroupés au niveau du plan $z=0$ de la cellule (au niveau de la membrane basale) atteste d'un remodelage des microtubules en XY également (Figure 3 A et B du papier).

Suite à cette observation, nous nous sommes demandés si la formation du pilier n'était pas induite uniquement à cause de l'effet stabilisateur de MAP4 sur les microtubules. Cependant la disparition du pilier après que les centrioles aient atteints la membrane va à l'encontre de cette hypothèse de sur-stabilisation. Ce pilier n'a pas pu être observé dans les cellules non transduites par MAP4 et fixées avec de la paraformaldéhyde ou de la glutaraldéhyde. Afin de savoir si le défaut d'observation de pilier n'était pas dû, soit à l'étape de fixation des cellules, soit à l'absence de MAP4, les cellules ont été transduites avec MAP4 puis fixées. Dans ce cas, aucun pilier tel que j'avais pu le voir auparavant n'a pu être authentifié, indiquant que la fixation désassemble probablement ce pilier très instable. A partir de ce moment, nous n'avons plus parlé de pilier mais de densification du réseau de microtubules.

Augmentation de EB1 et de tubuline gamma lors de la course du corps basal vers la membrane apicale

Sur cellules fixées, une forte densité de l'intensité de la tubuline alpha (après marquage en immunofluorescence) lorsque le corps basal est en position intermédiaire ou en position haute dans la cellule (en z) était notable. A l'inverse, lorsque le corps basal est en position basale, aucune augmentation de la tubuline alpha n'était observée. La quantification de l'intensité

moyenne de la tubuline alpha a été effectuée sur des images provenant de projection maximale de l'ensemble des images (ou z-stacks) couvrant la cellule en z. Par ailleurs, la quantification a été réalisée dans une région limitée comprenant les centrioles. Elle révèle une corrélation directe entre l'intensité de la tubuline alpha avec la position en z du corps basal. En d'autres termes, plus le corps basal est en position haute dans la cellule, plus l'intensité moyenne de la tubuline alpha autour du corps basal augmente (Figure 3C). Il s'est avéré ensuite que l'intensité de EB1 suit également cette tendance (Figure 3E). Cependant l'intensité de la tubuline gamma reste globalement inchangée. A ce propos, Choi et collaborateurs montrent que la protéine CDK5RAP2 (une protéine du PCM et de surcroît un activateur du complexe gamma TuRC) stimule la nucléation des microtubules. Cela signifie que la nucléation des microtubules peut augmenter alors que le niveau de la tubuline gamma reste constant (Y. Choi et al. 2010).

L'accumulation centrosomale de EB1 durant la course du corps basal peut être le témoin d'au moins deux événements, (exposés dans l'introduction de cet article hypothèse 2 Figure 60B):

Eventualité A/ un nombre de microtubules accru au corps basal durant la course de ce dernier.

Eventualité B/une diminution de phénomènes de catastrophes augmentant la stabilité des microtubules et donc augmentant la longueur des microtubules.

Au cours de cette étude, j'ai donc mis des expériences en place afin confirmer ou d'infirmer ces deux éventualités

Eventualité A :

Pour ce faire, il fallait mesurer le taux de nucléation à différents temps, avant et pendant le déplacement du corps basal. Pour cela, le nombre comètes EB1 émanant du centrosome peut être quantifier grâce à l'utilisation d'un spinning disk sur les cellules confinées exprimant EB1-GFP, après le retrait de sérum. Des acquisitions d'images ont été effectuées en z toutes les 30 secondes pendant 3 minutes (visualisation de la vitesse des comètes) et ce, toutes les 20 minutes (afin de comparer tous les profils de la cinétique après sevrage). Malheureusement, nous nous sommes heurtés à des difficultés de visualisation des microtubules en 3D. En effet, lors de la migration du corps basal, de nombreuses comètes se dirigent dans le même plan que le centrosome (en 2D) mais la majorité de comètes se dirigent vers le bas et surtout vers le haut de la cellule, rendant délicate la détection des comètes et donc la quantification. Cette expérience n'a donc pas été fructueuse, même si l'on peut juger de la directionnalité privilégiée des comètes après sevrage qui est l'axe basal/apical.

Toujours dans l'idée de tester l'éventualité A (à savoir si un nombre de microtubules était plus important au cours de la course du corps basal), je me suis demandée si la densification de la tubuline alpha n'était pas conséquence d'une augmentation du taux de nucléation ou de l'ancrage des microtubules au corps basal.

Etant pour le moment dans l'impossibilité de déterminer si le nombre de comètes EB1 provenant du corps basal est augmenté après le sevrage, je me suis intéressée à savoir si on pouvait déterminer un éventuel changement dans le taux de nucléation des microtubules au centrosome ou un ancrage plus important des microtubules. Une variation dans le taux de nucléation peut être révélée par un test de croissance de microtubules après complète dépolymérisation avec le nocodazole suivie d'une incubation des cellules sur un lit de glace (ou

« regrowth assay ») (expérience non représentée pour le moment dans le papier car en cours de confirmation). L'ajout de milieu chaud induit une croissance des microtubules émanant du centrosome. Les expériences effectuées ont montré que cinq minutes d'incubation à 37°C ne permet pas de distinguer de différences de longueur ni de nombre accru de microtubules entre les cellules seules confinées cultivées avec ou sans sérum (cinétique 0/2/3/4h). Ainsi l'augmentation de la tubuline alpha auparavant observée autour du centrosome n'est vraisemblablement pas la conséquence d'une augmentation de la nucléation des microtubules. Si le taux de nucléation semble rester constant, serait-ce l'ancrage des microtubules au corps basal qui est augmenté lors de son mouvement vers la membrane apicale? Le test de repolymérisation des microtubules a ainsi été effectué sur des temps plus longs (20 min et 40 min après l'addition de milieu chaud). Ce test semble vérifier cette hypothèse. En effet, après un temps plus long de croissance de microtubules, l'intensité de la tubuline alpha est augmentée dans les cellules confinées et sevrées par rapport aux cellules confinées non sevrées. Ces résultats signifieraient que la migration du corps basal est associée à une augmentation de l'ancrage des microtubules au corps basal. L'effet de l'inhibition de Kif3A sur la migration du corps basal lors de notre crible conforte notre hypothèse car celle-ci a un rôle en association avec p150^{glued} dans l'organisation des appendices subdistaux (Kodani et al. 2013). Il serait intéressant de caractériser la repolymérisation des microtubules lors d'un regrowth assay dans les siCTR versus siKif3A. Par ailleurs, l'inhibition de p150^{glued} pourrait permettre d'apporter également un élément supplémentaire à notre postulat dans le cas où elle induit également un défaut de migration du corps basal.

En conclusion de l'éventualité A, un nombre accru de microtubules pourrait être envisagé. Il pourrait provenir d'un ancrage plus élevé des microtubules au corps basal lors de la ciliogénèse et pourrait représenter une des causes du décentrage de ce dernier (Figure 60 B).

Rôle de la vésicule ciliaire

Nous nous sommes à ce moment là interrogés sur le rôle de la vésicule ciliaire laquelle s'associe à l'extrémité distale du centriole père lors des phases précoces de la ciliogénèse. En effet, à l'issue du mini crible, nous avons démontré que l'inhibition de CEP164 et de IFT20 induit un défaut de migration du corps basal. Par ailleurs, il a été rapporté que l'absence de ces deux protéines sont à l'origine d'un défaut d'association de la vésicule ciliaire avec le centriole père (Joo et al. 2013; Schmidt et al. 2012). Ces deux événements sont-ils corrélés? Dans quelle mesure la vésicule ciliaire pourrait-elle contribuer au transport du corps basal? Hehnly et collaborateurs ont démontré que des vésicules positives pour Rab11 acheminent des nucléateurs (tubuline gamma) et autres composants comme EB1 au fuseau mitotique afin d'activer la polymérisation des microtubules astraux et générer un fuseau robuste (Hehnly & Doxsey 2014). On peut ainsi se demander si la présence de la vésicule ciliaire ne serait pas essentielle au transport du corps basal en favorisant l'apport de composants nécessaires à l'attachement des microtubules au corps basal (dans notre cas p150^{glued}, KIF3A etc.) lors de la ciliogénèse. Malheureusement, la non-spécificité des anticorps que j'ai utilisés pour marquer la vésicule ciliaire ne m'a pas permis dans notre système de caractériser le moment précis où la vésicule interagit avec le centriole père. Celui-ci aurait permis de faire une éventuelle corrélation avec l'augmentation de la tubuline alpha au centrosome après le retrait de sérum.

D'autre part, une éventuelle corrélation entre migration du corps basal et ancrage de la vésicule ciliaire au centriole père pourrait supposer que la vésicule ciliaire, en se liant aux microtubules via des kinésines pourrait être responsable du transport du corps basal. Un crible

utilisant des siARN ciblant des kinésines et autres moteurs moléculaires est envisagé afin de tester cette nouvelle hypothèse (hypothèse 3 de l'introduction de l'article).

La stabilité des microtubules et la force de poussée

Toutes ces observations tendent donc à montrer que l'ancrage des microtubules au corps basal est stimulé après sevrage et pourrait être à l'origine du transport du corps basal vers la surface dorsale. Cependant, même si beaucoup d'éléments tendent à apporter des preuves à cette hypothèse, les quantifications révèlent des variations subtiles entre les différentes conditions. Comme exposé dans la figure 60 B, outre un nombre élevé de microtubules, une augmentation de la longueur des microtubules contribuerait aussi au décentrage du corps basal (**éventualité B**). C'est pourquoi, l'étude de la stabilité des microtubules a été réalisée en mesurant la résistance des microtubules au froid à différents temps après retrait de sérum. L'augmentation de la stabilité 2h après le sevrage comparativement aux cellules non sevrées est très significative et reproductible. Cette augmentation de longueur peut s'expliquer par une diminution du phénomène de dépolymérisation des microtubules. La simulation numérique réalisée par Cytosim permet de confirmer cette hypothèse. Cette simulation effectuée par une étudiante en thèse, Gaëlle Letort, a fixé différents paramètres (rigidité des microtubules, vitesse de polymérisation, de dépolymérisation, taux de sauvetage, de catastrophe etc.). Elle montre qu'en faisant varier le taux de catastrophe, le décentrage (ou montée) du corps basal est plus efficace quand le taux de catastrophe diminue.

De part la reproductibilité et la significativité statistiques des mesures expérimentales, c'est un résultat majeur et solide de notre étude. En effet jusqu'à présent, très peu de publications démontrent le rôle direct du réseau de microtubules sur la ciliogénèse. Rao et collaborateurs montrent que lors de l'induction de la ciliogénèse *in vitro*, l'activité de l'acétyltransférase α TAT1/MEC17 est augmentée, induisant un niveau d'acétylation des microtubules plus élevé. Ils suggèrent que l'acétylation contribue à la formation de l'axonème ciliaire et à l'augmentation de l'isoforme MYH10 de la myosine II, mais n'apportent pas d'élément quant à la conséquence de cette acétylation sur le comportement des microtubules à proprement parler (Rao et al. 2014). Or, nos expériences révèlent que le niveau d'acétylation augmente à 2h, c'est à dire au moment où le corps basal quitte la membrane basale pour se diriger vers la membrane apicale. Se produisant très tôt, l'acétylation joue ici un rôle autre que l'élongation du cil, puisque ce dernier se forme plus tardivement, après 8/12h de sevrage.

Des questions subsistent : Quelles sont les causes de cette augmentation de stabilité ? Le sevrage peut être un des éléments mis en cause, d'autant que le phénomène de stabilité est présent uniquement au temps 2h, et ce dans la majorité des cellules. D'après Rao et collaborateurs, l'activité de α TAT1/MEC17 est stimulée par le retrait de sérum (Rao et al. 2014). Un changement de dynamique du cytosquelette d'actine, une activation de RhoA, des changements dans les adhésions cellule/matrice extracellulaire peuvent également être à l'origine du phénomène de stabilité observé. L'inhibition de α TAT1/MEC17 serait une expérience à réaliser dans notre étude. En effet, elle permettrait d'observer si la diminution d'acétylation de la tubuline contribue à la migration du corps basal. Le cas échant, cela soulignerait l'importance de la stabilité des microtubules dans le décentrage du centrosome. Dans le même ordre d'idée, Cep70 est impliquée dans la stabilité des microtubules en régulant l'acétylation de la tubuline (Shi et al. 2015). Elle serait également un bon candidat pour vérifier qu'une perte d'acétylation de la tubuline en réponse à l'inhibition de Cep70 empêche la montée du corps basal. Il serait également envisageable de déterminer si la résistance au froid des microtubules est diminuée en réponse à l'inhibition de Cep70.

B. Les forces de traction exercées sur le corps basal

Comme exposé en introduction, les forces de tractions exercées par la dynéine localisée à la membrane apicale sont prédominantes dans de nombreux processus biologiques comme la migration, la division et la formation de la synapse immunologique. Il semblait donc essentiel de déterminer si ces forces pouvaient également être mises en jeu lors de migration du corps basal. Pour ce faire, j'ai testé des anticorps ciblant les protéines NuMA et p150^{glued}, deux acteurs dans les forces de traction. La quantification de l'intensité moyenne de NuMA de la cellule entière suite aux projections maximales en z, et ce, à différents temps après le sevrage a permis de révéler une abondance accrue de cette protéine après 4h de retrait de sérum (Figure S2 C). De plus, des images réalisées au confocal révèlent que NuMA se localise plus spécifiquement à la membrane apicale (Figure S2 D). La quantification de NuMA spécifiquement au niveau de la membrane dorsale aurait été plus adaptée dans ce cas, mais les acquisitions d'images en vue de réaliser une quantification n'ayant pas été effectuées avec un microscope confocal, cela n'a pas été possible. Concernant p150^{glued}, elle se trouve localisée à la fois à la membrane dorsale et au centrosome. Je n'ai ainsi quantifié que l'intensité moyenne de ce marquage au centrosome (Figure S2 B). De même que pour NuMA, il faudrait effectuer une série d'acquisitions d'images avec un confocal pour obtenir des images adaptées pour une quantification de l'intensité de fluorescence de cette protéine à la membrane.

Quant à l'eitrine, sa forme phosphorylée augmente dès 2h après le retrait de sérum (Figure S2 A). Si l'on compare l'intensité moyenne après la projection en z des séries d'images issues de cellules sevrées et non sevrées, on peut observer une différence d'intensité nette à partir de 8h seulement. Ce temps correspond au moment où les cellules commencent à former un cil primaire. La révélation de l'existence d'un remodelage de l'actine corticale lors de la ciliogénèse indique que la présence de l'eitrine phosphorylée à la membrane apicale peut être nécessaire, non pas au transport du corps basal, mais plus spécifiquement au processus d'ancrage et de positionnement du corps basal à la membrane. Il aurait été intéressant de tester d'autres marqueurs de polarité comme gp135/podocalyxine afin d'étudier leur localisation après le retrait de sérum.

L'ensemble de ces données révèle qu'il existe probablement des forces de traction. Cependant, elles surviennent plus tardivement que les forces de poussée. Elles pourraient alors compléter les forces de poussée afin de placer correctement le corps basal à la membrane apicale juste avant le processus d'élongation du cil.

L'inhibition de la dynéine suite à l'addition de la ciliobrévine D au moment du retrait de sérum inhibe le transport du corps basal. Ce résultat peut témoigner d'un effet inhibiteur de la force de traction. Il peut être aussi la conséquence d'une distance qui se trouve augmentée entre le noyau et le centrosome. Cet événement auparavant démontré pour jouer un rôle négatif dans le mouvement du corps basal pourrait expliquer le défaut de migration plutôt qu'un défaut de force de traction (Dawe et al. 2009). Ce point reste à élucider (non montré dans le papier). Il serait peut être envisageable d'inhiber p150^{glued} qui est certainement plus spécifique de la force de traction.

C. Migration du corps basal et réorganisation du cytosquelette d'actine

Il a été rapporté que la migration du corps basal requiert une activation de RhoA, mais aussi de MYH10, une isoforme de la myosine II (Eguether et al. 2014; Chevalier et al. 2015; Hong et al. 2015). La cinétique de phosphorylation de MLC2 (Myosin Light Chain 2) en

immunofluorescence (0h/2h/4h) montre une contractilité des filaments d'actine croissante au cours du temps après le retrait de sérum (Figure 5B). Elle est à son apogée à 4h (dernier point de la cinétique) et se révèle être bien supérieure à celle des cellules cultivées en milieu supplémenté en sérum (données non montrées).

Quel est le rôle de cette contractilité ? Dans un premier temps, j'ai pu constater la présence d'arcs transverses décorés de myosine II phosphorylée traversant de toute part la cellule peu après le retrait de sérum (Figure 5B). Ces arcs transverses semblent briser la symétrie initiale de la cellule et pousser le noyau en périphérie. Pourquoi le noyau est-il décentré ? Le décentrage du noyau pourrait-il également contribuer au mouvement du corps basal ? Mais dans quelle mesure ? En se décalant, le noyau pourrait laisser plus de place au centrosome afin qu'il puisse se mouvoir. Rien n'est sûr... Une autre hypothèse envisagée serait que la compression du noyau exercée par les filaments d'actine change la morphologie du noyau et l'étire vers le haut ou même le fasse « rouler ». Le corps basal connecté au noyau, pourrait ainsi être transporté vers le haut de la cellule. Les mesures de la hauteur du noyau au cours du temps ont indiqué une élévation du noyau en z (données non montrées). En revanche, les mesures de sa position en xy se sont révélées délicates étant donné le fait que les mesures ont été réalisées à partir de projections en z. Pour palier aux variations de morphologie atténuées ou masquées par la projection en z, il faudrait réaliser des mesures en 3D et caractériser précisément sa position au cours du temps.

En revanche, il est clair que la contractilité influe sur la migration du corps basal. Son rôle est démontré suite au traitement des cellules avec la blebbistatine (inhibiteur de la myosine II). Il a pour effet d'empêcher la migration du corps basal. Cependant, le noyau reste en position décentrée indiquant que ce paramètre n'est pas essentiel à une migration du corps basal effective.

D'autre part, la contractilité pourrait stimuler le flux rétrograde d'actine. En se liant à ces filaments d'actine se mouvant vers le haut de la cellule, le corps basal pourrait être transporté comme dans un ascenseur. Cependant, aucune augmentation du flux rétrograde significative a été mesurée au cours du temps suite à la privation de sérum, rejetant ainsi cette hypothèse.

Enfin, la contractilité pourrait contribuer à l'organisation de la membrane apicale et à la localisation de protéines de polarité. Dans l'embryon de *C. elegans*, ce phénomène permet l'établissement d'une polarité antéro-postérieure en ségrégeant les protéines PAR aux différents pôles (Munro et al. 2004). Dans notre étude, NuMA et p150^{glued} se situent au niveau de la membrane dorsale à partir de 4h et la forme phosphorylée de l'eitrine à 8h, au moment où la contractilité est très forte (Figure S2). Par ailleurs, j'ai pu constater que la blebbistatine diminue l'intensité de fluorescence de NuMA et de la forme phosphorylée de l'eitrine dans les cellules privées de sérum suggérant le rôle de la contractilité dans la construction du pôle apical (données non montrées). Cependant les différences sont peu statistiquement significatives, cette hypothèse est fragile et manque de données supplémentaires.

D. Dialogue entre le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules

De façon surprenante, une co-localisation entre les microtubules et les filaments d'actine a été observée de façon claire, spécialement en périphérie cellulaire suite au retrait de sérum (Figure 5A). C'est une région peu volumineuse car excluant le noyau. Par ailleurs, la résistance au froid des microtubules 2h après la privation de sérum est diminuée en réponse à l'addition de

blebbistatine (Figure 5D). Et à l'inverse, nous avons constaté que la ciliobrévine D affecte l'organisation du cytosquelette d'actine.

Est-ce la contractilité des filaments d'actine qui impose l'organisation des microtubules ou le réseau de microtubule qui régule la disposition des filaments d'actine ? Les travaux de Brangwynne tendent à montrer que la première supposition pourrait être vraie, même si pour le moment, il est difficile de trancher. En effet, l'effet de courbure des microtubules en périphérie cellulaire est induite par des forces de compression exercée principalement par la contractilité des filaments d'actine (Brangwynne 2006). Par ailleurs, les forces de compression induite par la myosine II sont responsables du regroupement des microtubules en fagot (« microtubule bundling ») dans les cônes de croissance neuronaux (Burnette et al. 2008). Les deux hypothèses pourraient aussi se révéler être justes.

De façon intéressante, la contractilité (forte à 4h) survient après l'acétylation de la tubuline qui a lieu à 2h. Ces résultats se trouvent être en accord avec ceux de l'étude de Rao montrant l'implication de α TAT1/MEC17 dans l'activation de MYH10.

A ce jour, nous ne pouvons pas déterminer le rôle de la contractilité. Toutes les hypothèses envisagées ont été infirmées.

E. Effet de la privation de sérum

Dans notre étude, la ciliogénèse est induite par le retrait de sérum. Cette dernière est connue pour induire différents processus essentiels au déclenchement du processus ciliogénique. En effet, il stimule α TAT1/MEC17, les facteurs de transcription YAP/TAZ, le miR129 (Rao et al. 2014; Hong et al. 2015; Cao et al. 2012). En activant le miR129, le sevrage diminue par conséquent l'expression de CP110 et empêche la formation du réseau branché (Cao et al. 2012). Le retrait de sérum représente un processus non physiologique. C'est pourquoi, il serait intéressant de tester l'engagement des cellules dans la ciliogénèse sans l'aide du retrait de sérum. Les cellules souches mésenchymateuses, capables de développer un cil primaire dans ces conditions représenteraient dans ce cas un bon modèle.

F. Le crible ARN interférence

La réalisation du crible, même si les résultats se résument en une seule figure a duré la moitié de la thèse. Il avait pour objectif de cribler des modulateurs positifs de la ciliogénèse et de caractériser ceux qui contribuent à la migration du corps basal (nom de gènes Figure 63 et protocole Figure 64). A l'exception de KLC1, tous les gènes ont été ciblés avec deux séquences de siARN différentes. A l'issue de ce crible, nous avons pu constater que tous les siARN testés ont provoqué une réduction du nombre de cellules ciliées, de façon plus ou moins forte. Une mesure manque à ce crible, elle concerne la quantification de la taille du cil. En effet, j'ai pu remarquer que dans les cellules déficientes en PARD3, les cils apparaissaient très courts, appelés dans la littérature « pro-cilia » et aussi observés dans les MDCK (Sfakianos et al. 2007). Concernant la péricentrine, la transfection des siARN affecte seulement la migration du corps basal. La fonction de cette protéine a été rapportée comme complexe aux vues des multiples variants de cette protéine jouant des rôles fonctionnels distincts (Mühlhans & Gießl 2012).

Nous avons identifié 10 gènes impliqués dans la migration du corps basal. Deux d'entre eux sont des confirmations de données déjà publiées, ils concernent la meckeline et la nesprine 2G (Dawe et al. 2009; Adams et al. 2011). Nous avons choisi d'approfondir le rôle de Cep164 et

d'étudier l'effet de son inhibition sur le remodelage du cytosquelette. De façon surprenante, la déplétion de CEP164 compromet à la fois la contractilité des filaments d'actine et la stabilité des microtubules contrairement à celle d'IFT88, impliquée seulement dans la phase d'élongation du cil (Figure 6). Les mécanismes d'action restent à être caractérisés. De nombreux composants ciliaires ont été rapportés pour posséder des fonctions dites extra-ciliaires. Par exemple, la déplétion de CEP164, associée au développement de néphropathie, induit un processus apoptotique, des dommages à l'ADN ainsi qu'une transition épithéliale mésenchymateuse (Slaats et al. 2014). Une diminution du nombre ou de la maturation des adhésions focales est envisageable dans ce cas, pouvant peut être expliquer une perturbation du cytosquelette. Par ailleurs, d'autres protéines ciliaires agissent sur le cytosquelette. Kif3a joue un rôle clé dans la dynamique et l'orientation des microtubules. En effet, elle a la capacité de se lier aux microtubules situés au front avant des MDCK en cours de migration (Boehlke et al. 2013). Un autre exemple concerne la meckeline qui, en interagissant avec une protéine du cytosquelette d'actine, la filamine A, favorise le positionnement du corps basal lors de la ciliogénèse (Adams et al. 2011). La caractérisation du rôle de Cep164 sur le remodelage du cytosquelette nécessite de nombreuses investigations. Il serait également intéressant de tester la stabilité et la contractilité après la transfection de siARN ciblant des autres gènes contribuant au mouvement du corps basal.

Lors du crible, un gène encore inconnu dans son rôle dans la ciliogénèse a été identifié : le gène codant la protéine émerine. Comme exposé en introduction, cette protéine appartient au complexe LINC et permet de maintenir une distance noyau/centrosome optimale. Par ailleurs, elle possède un domaine extranucléaire interagissant directement avec le réseau de microtubules cytoplasmiques. A l'instar de la nesprine 2G, l'émerine contribue au processus ciliogénique. Il serait intéressant de tester d'autres composants du complexe LINC comme les protéines SUN, la lamine A afin de caractériser leur implication dans l'étape de migration du corps basal.

CONCLUSIONS ET PERPECTIVES

La formation du cil primaire est l'aboutissement d'une succession d'étapes cytoplasmiques hautement contrôlées et régulées. L'étape concernant la migration du corps basal à la membrane apicale reste encore mal comprise. A travers ces deux études, l'implication du cytosquelette d'actine et de microtubules ainsi que certains composants ciliaires ont été mis en lumière dans les cellules RPE1. Le transport du corps basal au cortex nécessite la contractilité des filaments d'actine ainsi qu'une stabilité des microtubules. Néanmoins, il est clair que ces deux événements doivent être modérés et contrôlés. En effet, une élévation trop importante de la contractilité et/ou de l'acétylation des microtubules a pu être observée après 24h de sevrage sur des cellules fortement étalées. Ces événements sont associés à un défaut de migration du corps basal.

Le rôle exact de l'actine reste encore à déterminer. Il a été rapporté qu'un réseau d'actine spécifique à la surface apicale est nécessaire à l'ancrage du corps basal à la membrane apicale. Différentes protéines modulatrices de l'architecture du cytosquelette d'actine contribuent positivement ou négativement à la ciliogénèse. En modifiant l'architecture du cytosquelette d'actine, elles peuvent favoriser ou empêcher le mouvement du corps basal. Il semblerait que le réseau branché interfère négativement avec la ciliogénèse et qu'à l'inverse la dissociation des filaments d'actine favorise la formation du cil primaire. Quels sont les médiateurs liant ces deux processus : structure d'actine/migration ? De nombreuses questions restent encore non élucidées...

L'implication du réseau de microtubules dans le décentrage du centrosome est prépondérante dans d'autres processus biologiques comme la migration, la division ou encore la formation de la synapse immunologique. Son rôle lors de la ciliogénèse n'avait pas encore été décrit. Dans ce contexte, les microtubules, en augmentant leur stabilité, exercent vraisemblablement une force de poussée, entraînant le corps basal vers le haut de la cellule. Les microtubules semblent également attirer le corps basal à la membrane apicale via des forces de traction. Mais celles-ci prendraient part au processus plus tardivement que les forces de poussée.

Les deux éléments du cytosquelette sont en interaction physique et fonctionnelle. Une désorganisation de l'un impacte l'autre et *vice versa*. Comment ces deux réseaux communiquent-ils lors de la ciliogénèse ? Lors de notre première étude, nous avons révélé le rôle négatif d'une forte contractilité sur la migration du corps basal. Suite à la découverte du rôle crucial de la stabilité des microtubules lors des phases précoces de la ciliogénèse, il est opportun de se demander si le défaut de migration présent dans les cellules étalées ne serait pas provoqué également par une absence de stabilité des microtubules.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, M. et al., 2011. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Human molecular genetics*, 21(6), pp.1272–86.
- Afzelius, B. a, 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science (New York, N.Y.)*, 193(4250), pp.317–319.
- Akhshi, T.K., Wernike, D. & Piekny, A., 2014. Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton*, 71(1), pp.1–23.
- Antoniades, I., Stylianou, P. & Skourides, P.A., 2014. Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell*, 28(1), pp.70–80.
- Aragona, M. et al., 2013. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*, 154(5), pp.1047–59.
- Azimzadeh, J. & Bornens, M., 2007. Structure and duplication of the centrosome. *Journal of cell science*, 120(Pt 13), pp.2139–2142.
- Azioune, A. et al., 2009. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a Chip*, 9(11), p.1640.
- Baas, A.F. et al., 2004. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell*, 116(3), pp.457–466.
- Barker, A.R., McIntosh, K. V. & Dawe, H.R., 2015. Centrosome positioning in non-dividing cells. *Protoplasma*.
- Bartolini, F. & Gundersen, G.G., 2010. Formins and microtubules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(2), pp.164–173.
- Basten, S.G. & Giles, R.H., 2013. Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. *Cilia*, 2(1), p.6.
- Benmerah, A., 2014. La poche ciliaire : fruit des liaisons du centrosome avec le trafic vésiculaire. *Medecine sciences*, 30.
- Benmerah, A., 2012. The ciliary pocket. *Current opinion in cell biology*, pp.1–7.
- Berbari, N.F. et al., 2013. Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton*, 70(1), pp.24–31.
- Berbari, N.F. et al., 2012. Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton*, 70(1), pp.24–31.
- Blanchoin, L. et al., 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1), pp.235–63.
- Blitzer, A.L. et al., 2011. Primary cilia dynamics instruct tissue patterning and repair of corneal endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp.2819–24.

- Boehlke, C. et al., 2013. Kif3a Guides Microtubular Dynamics, Migration and Lumen Formation of MDCK Cells. *PLoS ONE*, 8(5), p.e62165.
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C. & Sandoz, D., 1989. In vitro effects of taxol on ciliogenesis in quail oviduct. *Journal of cell science*, 92 (Pt 1), pp.9–20. A
- Boisvieux-Ulrich, E., Lainé, M.C. & Sandoz, D., 1990. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell and tissue research*, 259(3), pp.443–454.
- Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1), pp.25–34.
- Bornens, M., 2012. The Centrosome in Cells and Organisms. *Science*, 335(6067), pp.422–426.
- Bowen, J.R. et al., 2011. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *The Journal of cell biology*, 194(2), pp.187–97.
- Brangwynne, C.P., 2006. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *The Journal of Cell Biology*, 173(5), pp.733–741.
- Burakov, A. et al., 2003. Centrosome positioning in interphase cells. *The Journal of cell biology*, 162(6), pp.963–9.
- Burke, M.C. et al., 2014. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 207(1), pp.123–137.
- Burnette, D.T. et al., 2008. Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental cell*, 15(1), pp.163–9.
- Cajánek, L. & Nigg, E. a, 2014. Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *PNAS*, pp.1–10.
- Cao, J. et al., 2012. miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nature Cell Biology*, 14(7), pp.697–706.
- Cervantes, S. et al., 2010. Primary cilia regulate Gli/Hedgehog activation in pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), pp.10109–14.
- Chang, W., Worman, H.J. & Gundersen, G.G., 2015. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *Journal of Cell Biology*, 208(1), pp.11–22.
- Chevalier, B. et al., 2015. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature Communications*, 6, p.1.

- Chevrier, V. et al., 2002. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *The Journal of cell biology*, 157(5), pp.807–17.
- Choi, Y. et al., 2010. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the gamma tubulin ring complex. *Journal of Cell Biology*, 191(6), pp.1089–1095.
- Choi, Y.-K. et al., 2010. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex. *The Journal of Cell Biology*, 191(6), pp.1089–1095.
- Choksi, S.P. et al., 2014. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 141(7), pp.1427–41.
- Clucas, J. & Valderrama, F., 2015. ERM proteins in cancer progression. *Journal of Cell Science*, 128(6), pp.267–275.
- Craige, B. et al., 2010. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *Journal of Cell Biology*, 190(5), pp.927–940.
- Dawe, H.R. et al., 2009. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 122(Pt 15), pp.2716–2726.
- Dawe, H.R., Smith, U.M., et al., 2007. The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Human molecular genetics*, 16(2), pp.173–86.
- Dawe, H.R., Farr, H. & Gull, K., 2007. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of cell science*, 120(Pt 1), pp.7–15.
- Delaval, B. et al., 2011. The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nature Cell Biology*, 13(4), pp.461–468.
- Distel, M. et al., 2010. The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *Journal of Cell Biology*, 191(4), pp.875–890.
- Dupont, S. et al., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), pp.179–83.
- Efimov, A. et al., 2007. Asymmetric CLASP-Dependent Nucleation of Noncentrosomal Microtubules at the trans-Golgi Network. *Developmental Cell*, 12(June), pp.917–930.
- Egeberg, D.L. et al., 2012. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia*, 1(1), pp.1–17.
- Egorova, A.D. et al., 2011. Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation research*, 108(9), pp.1093–101.

- Eguether, T. et al., 2014. The deubiquitinating enzyme CYLD controls apical docking of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature communications*, 5(4585), pp.1–14.
- Epting, D. et al., 2015. The Rac1 regulator ELMO controls basal body migration and docking in multiciliated cells through interaction with Ezrin. *Development (Cambridge, England)*, 142(1), pp.174–84.
- Etienne-Manneville, S., 2004. Cdc42 the centre of polarity. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), pp.1291–1300.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2002. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature*, 420(December), pp.629–635.
- Ezratty, E.J. et al., 2011. A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell*, 145(7), pp.1129–41.
- Farina, F et al., 2015. The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat Cell Biol*, 18(1); pp65-75.
- Firestone, A.J. et al., 2012. Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. *Nature*, 484(7392), pp.125–129.
- Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H., 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), pp.880–93.
- Follit, J. a et al., 2008. The Golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the Golgi complex. *PLoS genetics*, 4(12), pp.1–14.
- Follit, J.A. et al., 2006. The Intraflagellar Transport Protein IFT20 Is Associated with the Golgi Complex and Is Required for Cilia Assembly. , 17(September), pp.3781–3792.
- De Forges, H., Bouissou, A. & Perez, F., 2012. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(2), pp.266–274.
- Fry, A.M. et al., 2012. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *Journal of cell science*, 125(Pt 19), pp.4423–33.
- Garcia-Gonzalo, F.R. et al., 2011. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nature genetics*, 43(8), pp.776–784.
- Gerdes, J.M., Davis, E.E. & Katsanis, N., 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, 137(1), pp.32–45.
- Gerlitz, G. & Bustin, M., 2011. The role of chromatin structure in cell migration. *Trends in Cell Biology*, 21(1), pp.6–11.
- Ghossoub, R. et al., 2013. Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *Journal of cell science*, 126(Pt 12), pp.2583–94.

- Ghossoub, R. et al., 2011. The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 103(3), pp.131–44.
- Goetz, S.C. & Anderson, K. V, 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), pp.331–44.
- Goetz, S.C., Liem, K.F. & Anderson, K.V., 2012. The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis. *Cell*, 151(4), pp.847–858.
- Goldstein, B. & Macara, I.G., 2007. The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Developmental Cell*, 13(5), pp.609–622.
- Gomes, E.R., Jani, S. & Gundersen, G.G., 2005. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*, 121(3), pp.451–63.
- Gönczy, P., 2015. Mécanismes de division cellulaire: leçons d'un nématode. *Medecine sciences*, 19, pp.735–742.
- Goode, B.L., Drubin, D.G. & Barnes, G., 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, pp.63–71.
- Graser, S. et al., 2007. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of cell biology*, 179(2), pp.321–30.
- Grill, S.W. & Hyman, A. a., 2005. Spindle Positioning by Cortical Pulling Forces. *Developmental Cell*, 8(4), pp.461–465.
- Gundersen, G.G., Gomes, E.R. & Wen, Y., 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Current opinion in cell biology*, 16, pp.106–112.
- Gundersen, G.G. & Worman, H.J., 2013. Nuclear positioning. *Cell*, 152(6), pp.1376–1389.
- Hale, C.M. et al., 2008. Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models. *Biophysical journal*, 95(11), pp.5462–75.
- Han, Y.-G. et al., 2009. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nature medicine*, 15(9), pp.1062–5.
- Harada, a. et al., 1998. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *Journal of Cell Biology*, 141(1), pp.51–59.
- Hassounah, N.B. et al., 2013. Primary Cilia Are Lost in Preinvasive and Invasive Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 8(7), pp.1–19.
- Hassounah, N.B., Bunch, T.A. & Mcdermott, K.M., 2012. Molecular Pathways : The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog

- Signaling. *Clinical cancer research*, (13), pp.2429–2436.
- Hebert, A.M. et al., 2012. Merlin/ERM proteins establish cortical asymmetry and centrosome position. *Genes & development*, 26(24), pp.2709–23.
- Hehnly, H. & Doxsey, S., 2014. Rab11 Endosomes Contribute to Mitotic Spindle Organization and Orientation. *Developmental Cell*, 28(5), pp.497–507.
- Hendricks, A.G. et al., 2012. Dynein tethers and stabilizes dynamic microtubule plus ends. *Current biology : CB*, 22(7), pp.632–7.
- Heng, Y.-W. & Koh, C.-G., 2010. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(10), pp.1622–1633.
- Hernandez-Hernandez, V. et al., 2013. Bardet-Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. *Human molecular genetics*, 22(19), pp.3858–68.
- Holy, T.E. et al., 1997. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6228–6231.
- Hong, H., Kim, J. & Kim, J., 2015. Myosin heavy chain 10 (MYH10) is required for centriole migration during the biogenesis of primary cilia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(1), pp.180–185.
- Hotulainen, P. & Lappalainen, P., 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*, 173(3), pp.383–94.
- Hsiao, Y.-C., Tuz, K. & Ferland, R.J., 2012. Trafficking in and to the primary cilium. *Cilia*, 1(1), pp.1–13.
- Huang, K., Diener, D.R. & Rosenbaum, J.L., 2009. The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella. *Journal of Cell Biology*, 186(4), pp.601–613.
- Huangfu, D. et al., 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426(November), pp.83–87.
- Huangfu, D. & Anderson, K. V, 2005. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *PNAS*, 102(32), pp.11325–11330.
- Irigoín, F. & Badano, J.L., 2011. Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Current genomics*, 12(4), pp.285–97.
- Ishikawa, H. et al., 2005. Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nature cell biology*, 7(5), pp.517–24.

- Ishikawa, H. & Marshall, W.F., 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4), pp.222–34.
- Jana, S.C., Marteil, G. & Bettencourt-Dias, M., 2014. Mapping molecules to structure: Unveiling secrets of centriole and cilia assembly with near-atomic resolution. *Current Opinion in Cell Biology*, 26(1), pp.96–106.
- Jaulin, F. & Kreitzer, G., 2010. KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *The Journal of Cell Biology*, 190(3), pp.443–460.
- Jin, H. & Nachury, M. V., 2007. Quick guide The BBSome Animal asymmetry. *Current Biology*, 19(12), pp.472–473.
- Jonassen, J. a et al., 2008. Deletion of IFT20 in the mouse kidney causes misorientation of the mitotic spindle and cystic kidney disease. *The Journal of cell biology*, 183(3), pp.377–84.
- Joo, E.E. & Yamada, K.M., 2014. MYPT1 regulates contractility and microtubule acetylation to modulate integrin adhesions and matrix assembly. *Nature communications*, 5, pp.1–13.
- Joo, K. et al., 2013. CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp.1–6.
- Jurczyk, A. et al., 2004. Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *Journal of Cell Biology*, 166(5), pp.637–643.
- Kim, J. et al., 2015. Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking. *Nature Communications*, 6, pp.1–13.
- Kim, J. et al., 2010. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature*, 464(7291), pp.1048–51.
- Kim, J., Dabiri, S. & Seeley, E.S., 2011. Primary cilium depletion typifies cutaneous melanoma in situ and malignant melanoma. *PLoS ONE*, 6(11), pp.1–7.
- Kim, S. et al., 2011. Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nature cell biology*, 13(4), pp.351–60.
- Kim, S. et al., 2015. Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. *Nature Communications*, 6, p.8087.
- Kleylein-Sohn, J. et al., 2007. Plk4-Induced Centriole Biogenesis in Human Cells. *Developmental Cell*, 13(2), pp.190–202.

- Kloc, M. et al., 2013. The newly found functions of MTOC in immunological response. *Journal of leukocyte biology*, 95(March), pp.1–14.
- Knödler, A. et al., 2010. Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), pp.6346–6351.
- Kobayashi, T. et al., 2011. *Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis*,
- Kobayashi, T. et al., 2014. The CP110-interacting proteins talpid3 and cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *Journal of Cell Biology*, 204(2), pp.215–229.
- Kobayashi, T. & Dynlacht, B.D., 2011. Regulating the transition from centriole to basal body. *The Journal of cell biology*, 193(3), pp.435–44.
- Kodama, A. et al., 2003. ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*, 115(3), pp.343–354.
- Kodani, A. et al., 2013. Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. *The EMBO journal*, 32(4), pp.597–607.
- Kozminski, K.G., Beech, P.L. & Rosenbaum, J.L., 1995. Kinesin-like Protein FLA10 Is Involved in Motility Associated with the Flagellar Membrane. *The Journal of cell biology*, 131(6), pp.1517–1527.
- Laan, L. et al., 2012. Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell*, 148(3), pp.502–514.
- Labbé, J.-C. et al., 2003. PAR proteins regulate microtubule dynamics at the cell cortex in *C. elegans*. *Current biology*, 13(7), pp.707–714.
- Laporte, D. et al., 2015. A stable microtubule array drives fission yeast polarity reestablishment upon quiescence exit. *The Journal of Cell Biology*, 210(1).
- Lasserre, R. et al., 2010. Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *The EMBO Journal*, 29(14), pp.2301–2314.
- Lechtreck, K.F., 2015. IFT-Cargo Interactions and Protein Transport in Cilia. *Trends in biochemical sciences*, xx, pp.1–14.
- Lefèvre, J. et al., 2013. Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), pp.24910–24922.
- Lemullois, M. et al., 1988. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol Cell*, 63(2), pp.195–208.

- Liao, J.-C. et al., 2015. TTBK2: A Tau Protein Kinase beyond Tau Phosphorylation. *BioMed Research International*, 2015, pp.1–10.
- Liem, K. et al., 2012. cilia structure and membrane protein trafficking. *Journal of Cell Biology*, 197(6), pp.789–800.
- Lin, F. et al., 2003. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *PNAS*, 100(9), pp.5286–5291.
- Liu, X. et al., 2013. Diacylglycerol promotes centrosome polarization in T cells via reciprocal localization of dynein and myosin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), pp.11976–81.
- Loktev, A. V et al., 2008. A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Developmental cell*, 15(6), pp.854–65.
- Lombardi, M.L. et al., 2011. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), pp.26743–53.
- Louvet, S. et al., 1996. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology*, 177(2), pp.568–79.
- Lu, Q. et al., 2015. Early steps in primary cilium assembly require EHD1 / EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nature Cell Biology*.
- Luxton, G.G. et al., 2011. TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. *Nucleus*, 2(3), pp.173–81.
- Luxton, G.W.G. et al., 2010. Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994), pp.956–9.
- Luxton, G.W.G. & Gundersen, G.G., 2011. Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(5), pp.579–588.
- Luxton, G.W.G. & Gundersen, G.G., 2011. Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Current opinion in cell biology*, 23(5), pp.579–88.
- Machicoane, M. et al., 2014. SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation. *Journal of Cell Biology*, 205(6), pp.791–799.
- Madhivanan, K. & Aguilar, R.C., 2014. Ciliopathies: The Trafficking Connection. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, (14).

- Mahjoub, M.R. & Stearns, T., 2012. Report Supernumerary Centrosomes Nucleate Extra Cilia and Compromise Primary Cilium Signaling. *Current Biology*, 22(17), pp.1628–1634.
- Maier, B. et al., 2013. The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells. *Cell Cycle*, 12(9), pp.1457–1471.
- Manneville, J.-B. & Etienne-Manneville, S., 2006. Positioning centrosomes and spindle poles: looking at the periphery to find the centre. *Biology of the Cell*, 98(9), pp.557–65.
- Martin-Belmonte, F. et al., 2007. PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell*, 128(2), pp.383–397.
- McCaffrey, L.M. & Macara, I.G., 2012. Signaling Pathways in Cell Polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), pp.a009654–a009654.
- Mellad, J. a, Warren, D.T. & Shanahan, C.M., 2011. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*, 23(1), pp.47–54.
- Menzl, I. et al., 2014. Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development. *Cilia*, 3, pp.1–16.
- Michaud, E.J. & Yoder, B.K., 2006. The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer research*, 66(13), pp.6463–7.
- Miller, P.M. et al., 2009. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1069–1080.
- Mitchison, T. & Kirschner, M.W., 1984. Dynamic Instability of Microtubule growth. *Nature*, 312.
- Miyatake, K. et al., 2015. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature communications*, 6, p.6666.
- Molla-Herman, A. et al., 2010. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *Journal of cell science*, 123(Pt 10), pp.1785–1795.
- Mollinari, C. et al., 2002. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol*, 157(7), pp.1175–1186.
- Moss, D.K. et al., 2007. Ninein is released from the centrosome and moves bi-directionally along microtubules. *Journal of Cell Science*, 120(17), pp.3064–3074.
- Mühlhans, J. & Gießl, A., 2012. Pericentrin in health and disease: Exploring the patchwork of pericentrin splice variants. *Communicative and Integrative Biology*,

5(4), pp.304–307.

- Mukhopadhyay, S. et al., 2010. TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes & development*, pp.2180–2193.
- Munro, E., Nance, J. & Priess, J.R., 2004. Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Developmental Cell*, 7(3), pp.413–424.
- Müsch, A., 2004. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(1), pp.1–9.
- Nachury, M. V. et al., 2007. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*, 129(6), pp.1201–1213.
- Nance, J. & Zallen, J. a., 2011. Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. *Development*, 138(5), pp.799–809.
- Nelson, W.J., 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, 422(6933), pp.766–74.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K. & Gönczy, P., 2007. Coupling of cortical dynein and Gα proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology*, 9(11), pp.1294–1302.
- Nigg, E. a & Raff, J.W., 2009. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139(4), pp.663–78.
- Noatynska, A., Gotta, M. & Meraldi, P., 2012. Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *The Journal of cell biology*, 199(7), pp.1025–35.
- Novarino, G., Akizu, N. & Gleeson, J.G., 2011. Modeling human disease in humans: The ciliopathies. *Cell*, 147(1), pp.70–79.
- Oda, T. et al., 2014. Binding to Cep164, but not EB1, is essential for centriolar localization of TTBK2 and its function in ciliogenesis. *Genes to cells*, 19(12), pp.927–40.
- Pampliega, O. et al., 2013. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature*, 502(7470), pp.194–200.
- Pan, J. et al., 2007. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *Journal of cell science*, 120(Pt 11), pp.1868–76.
- Pan, J. & Snell, W., 2007. The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell*, 129(7), pp.1255–7.
- Pavin, N. et al., 2012. Positioning of microtubule organizing centers by cortical pushing and pulling forces. *New Journal of Physics*, 14.

- Pazour, G.J. et al., 2000. Chlamydomonas IFT 88 and Its Mouse Homologue , Polycystic Kidney Disease Gene Tg 737 , Are Required for Assembly of Cilia and Flagella. *The Journal of cell biology*, 151(3), pp.709–718.
- Pazour, G.J. et al., 2000. Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *The Journal of cell biology*, 151(3), pp.709–18.
- Pedersen, L.B. & Rosenbaum, J.L., 2008. *Intraflagellar transport (IFT): role in ciliary assembly, resorption and signalling* 1st ed., Elsevier Inc.
- Piccolo, S., Dupont, S. & Cordenonsi, M., 2014. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*, 94(4), pp.1287–312.
- Pinot, M. et al., 2009. Effects of confinement on the self-organization of microtubules and motors. *Current biology : CB*, 19(11), pp.954–60.
- Pitaval, A. et al., 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of cell biology*, 191(2), pp.303–12.
- Pitaval, A. et al., 2013. Probing Ciliogenesis Using Micropatterned Substrates. *Methods in Enzymology*, 525, pp.109–130.
- Plotnikova, O. V, Golemis, E.A. & Pugacheva, E.N., 2008. Cell Cycle – Dependent Ciliogenesis and Cancer. *Cancer Research*, (7), pp.2058–2061.
- Pugacheva, E.N. et al., 2007. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 129(7), pp.1351–63.
- Quinones, G.B. et al., 2011. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from deetyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular biology of the cell*, 22(7), pp.1045–57.
- Rao, Y. et al., 2014. A Mec17-Myosin II Effector Axis Coordinates Microtubule Acetylation and Actin Dynamics to Control Primary Cilium Biogenesis. *PLoS ONE*, 9(12), p.e114087.
- Reiter, J.F., Blacque, O.E. & Leroux, M.R., 2012. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO reports*.
- Reiter, J.F. & Griffiths, G.M., 2013. Killing at the Immunological Synapse. *Science*, 342, p.1247.
- Ritter, A.T. et al., 2015. Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse. *Immunity*, 42(5), pp.864–876.
- Ritter, A.T., Angus, K.L. & Griffiths, G.M., 2013. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunological Reviews*, pp.107–117.

- Robert, a. et al., 2007. The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *Journal of Cell Science*, 120(5), pp.918–918.
- Rocha, C. et al., 2014. Tubulin glycosylases are required for primary cilia , control of cell proliferation and tumor development in colon. *The EMBO journal*, 33(19), pp.2247–2260.
- Rodriguez, O.C. et al., 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology*, 5(7), pp.599–609.
- Rohatgi, R. & Snell, W.J., 2010. The ciliary membrane. *Current opinion in cell biology*, 22(4), pp.541–6.
- Rovina, D. et al., 2014. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) plays a role in cell cycle progression and cytoskeletal dynamics. *European journal of cell biology*, 4.
- Salmon, W.C., Adams, M.C. & Waterman-Storer, C.M., 2002. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *Journal of Cell Biology*, 158(1), pp.31–37.
- Salpingidou, G. et al., 2007. A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *The Journal of cell biology*, 178(6), pp.897–904.
- Sandoz, D. et al., 1988. Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 63(2), pp.183–193.
- Santos, N. & Reiter, J.F., 2008. Building it up and taking it down: the regulation of vertebrate ciliogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(8), pp.1972–81.
- Satish Tammana, T. V et al., 2013. Centrosomal protein CEP104 (Chlamydomonas FAP256) moves to the ciliary tip during ciliary assembly. *Journal of cell science*, 126, pp.5018–29.
- Scheer, U., 2014. Historical roots of centrosome research: discovery of Boveri's microscope slides in Würzburg. *Philosophical transactions of the Royal Society*, 369(1650), p.20130469–.
- Schmidt, K.N. et al., 2012. Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 199(7), pp.1083–1101.
- Schneider, L. et al., 2005. PDGFR α Signaling Is Regulated through the Primary Cilium in Fibroblasts. , 15, pp.1861–1866.
- Schrøder, J.M. et al., 2011. EB1 and EB3 promote cilia biogenesis by several centrosome-

- related mechanisms. *Journal of cell science*, 124(Pt 15), pp.2539–51. A
- Schrøder, J.M. et al., 2007. EB1 is required for primary cilia assembly in fibroblasts. *Current biology : CB*, 17(13), pp.1134–9.
- Serrador, J.M. et al., 2004. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*, 20(4), pp.417–428.
- Sfakianos, J. et al., 2007. Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 179(6), pp.1133–40. A
- Sharma, N. et al., 2011. Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Molecular Biology of the Cell*, 22(6), pp.806–816.
- Shi, X. et al., 2015. Cep70 regulates microtubule stability by interacting with HDAC6. *FEBS Letters*, 589(15), pp.1771–1777.
- Siller, K.H. & Doe, C.Q., 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature cell biology*, 11(4), pp.365–74.
- Sillibourne, J.E. et al., 2013. Primary ciliogenesis requires the distal appendage component Cep123. *Biology open*, 2(6), pp.535–45.
- Singla, V. et al., 2010. Article Odf1 , a Human Disease Gene , Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles. *Developmental Cell*, 18(3), pp.410–424.
- Slaats, G.G. et al., 2014. Nephronophthisis-Associated CEP164 Regulates Cell Cycle Progression, Apoptosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS genetics*, 10(10), p.e1004594.
- Solecki, D.J. et al., 2009. Myosin II Motors and F-Actin Dynamics Drive the Coordinated Movement of the Centrosome and Soma during CNS Glial-Guided Neuronal Migration. *Neuron*, 63(1), pp.63–80.
- Solinet, S. et al., 2013. The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *The Journal of Cell Biology*, 202(2), pp.251–260.
- Song, R. et al., 2014. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature*, 510(7503), pp.115–120.
- Sorokin, S., 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*, 15(10), pp.363–377.
- Spektor, A. et al., 2007. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*, 130(4), pp.678–90.
- Stinchcombe, J.C. & Griffiths, G.M., 2014. Communication , the centrosome and the immunological synapse. *Philosophical transactions of the Royal Society*.
- Sung, C.-H. & Leroux, M.R., 2013. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nature cell biology*, 15(12), pp.1387–97.

- Sütterlin, C. & Colanzi, A., 2010a. The Golgi and the centrosome: Building a functional partnership. *Journal of Cell Biology*, 188(5), pp.621–628.
- Sütterlin, C. & Colanzi, A., 2010b. The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of cell biology*, 188(5), pp.621–8.
- Szymanska, K. & Johnson, C., 2012. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia*, 1(1), p.10.
- Tamura, N. & Draviam, V.M., 2012. Microtubule plus-ends within a mitotic cell are “moving platforms” with anchoring, signalling and force-coupling roles. *Open biology*, 2(11), p.120132.
- Tang, N. & Marshall, W.F., 2012. Centrosome positioning in vertebrate development. *Journal of cell science*, 125(Pt 21), pp.4951–4961.
- Tanos, B.E. et al., 2013. Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes & development*, 27(2), pp.163–8.
- Tateishi, K. et al., 2013. Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. *The Journal of Cell Biology*, 203(3), pp.417–425.
- Thauvin-Robinet, C. et al., 2014. The oral-facial-digital syndrome gene C2CD3 encodes a positive regulator of centriole elongation. *Nature Genetics*, 46(8), pp.905–911.
- Théry, M. et al., 2006. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), pp.19771–6.
- Théry, M., 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of cell science*, 123(Pt 24), pp.4201–13.
- Théry, M. et al., 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature cell biology*, 7(10), pp.947–53.
- Théry, M. & Bornens, M., 2007. L ’ adhérence guide la polarité cellulaire. *Medecine Science*, 23.
- Thomas, J. et al., 2010. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biology of the Cell*, 102(9), pp.499–513.
- Tollenaere, M. a. X., Mailand, N. & Bekker-Jensen, S., 2014. Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1), pp.11–23.
- Trevor, K.T., McGuire, J.G. & Leonova, E. V, 1995. Association of vimentin intermediate filaments with the centrosome. *Journal of cell science*, 108 Pt 1, pp.343–356.

- Tsang, W.Y. & Dynlacht, B.D., 2013. CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *Cilia*, 2(1), p.1. Available at: Cilia.
- Tsukita, S. et al., 2012. Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell*, 148(1-2), pp.189–200.
- Tummala, P., Arnsdorf, E.J. & Jacobs, C.R., 2010. The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. *Cell Mol Bioeng.*, 3(3), pp.207–212.
- van der Vaart, B., Akhmanova, A. & Straube, A., 2009. Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), pp.1007–1013.
- Veleri, S. et al., 2014. Ciliopathy-associated gene Cc2d2a promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. *Nature communications*, 5(May), p.4207.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J. & Horwitz, a R., 2005. Cell migration at a glance. *Journal of cell science*, 118(Pt 21), pp.4917–4919.
- Vignaud, T., Blanchoin, L. & Théry, M., 2012. Directed cytoskeleton self-organization. *Trends in Cell Biology*, 22(12), pp.671–681.
- Wang, W., Wu, T. & Kirschner, M.W., 2014. The master cell cycle regulator APC-Cdc20 regulates ciliary length and disassembly of the primary cilium. *eLife*, pp.1–12.
- Wang, W.-J. et al., 2013. CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nature cell biology*, 15(6), pp.591–601.
- Wei, Q. et al., 2013. Transition fibre protein FBF1 is required for the ciliary entry of assembled intraflagellar transport complexes. *Nature communications*, 4, p.2750.
- Wei, Q., Ling, K. & Hu, J., 2015. The essential roles of transition fibers in the context of cilia. *Current opinion in cell biology*, 35, pp.98–105.
- Wen, Y. et al., 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology*, 6(9), pp.820–30.
- Westlake, C.J. et al., 2011. Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPP II) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp.2759–64.
- Wheatley, D.N., Wang, a M. & Strugnell, G.E., 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell biology international*, 20(1), pp.73–81.
- Wheway, G. et al., 2015. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nature cell biology*, (July 2014).

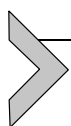
- White, M.C. & Quarmby, L.M., 2008. The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC cell biology*, 9, p.29.
- Williams, C.L. et al., 2011. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *Journal of Cell Biology*, 192(6), pp.1023–1041.
- Winyard, P. & Jenkins, D., 2011. Putative roles of cilia in polycystic kidney disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(10), pp.1256–62.
- Wittmann, T., Hyman, a & Desai, a, 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature cell biology*, 3(1), pp.E28–E34.
- Wojnacki, J. et al., 2014. Impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals. *Small GTPases*, (March).
- Wong, S.Y. et al., 2009. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature medicine*, 15(9), pp.1055–61.
- Yan, X. & Zhu, X., 2013. Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation. *Experimental cell research*, 319(2), pp.147–51.
- Yang, Y. et al., 2014. CYLD mediates ciliogenesis in multiple organs by deubiquitinating Cep70 and inactivating HDAC6. *Cell research*, 24(11), pp.1342–53.
- Ye, X. et al., 2014. C2cd3 is critical for centriolar distal appendage assembly and ciliary vesicle docking in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K. & Nelson, W.J., 1999. New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiological reviews*, 79(1), pp.73–98.
- Yi, J. et al., 2013. Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *Journal of Cell Biology*, 202(5), pp.779–792.
- Young, a et al., 2000. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Molecular biology of the cell*, 11(6), pp.2047–2056.
- Yvon, A.C. et al., 2002. Centrosome Reorientation in Wound-Edge Cells Is Cell Type Specific. *Molecular Biology of the Cell*, 13(June), pp.1871–1880.
- Zhang, X. et al., 2009. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. *Neuron*, 64(2), pp.173–187.

ANNEXES

Article méthodologie

Probing Ciliogenesis Using Micropatterned Substrates.

Pitaval, A., Christ, A., Curtet, A., Tseng, Q., & Théry, M. (2013)
Methods in Enzymology, 525, 109–130.



Probing Ciliogenesis Using Micropatterned Substrates

Amandine Pitaval^{*,†}, Andreas Christ^{*}, Alexis Curtet^{*},
Qingzong Tseng^{*}, Manuel Théry^{*,1}

^{*}Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, CNRS/UJF/INRA/CEA, Grenoble, France

[†]Laboratoire Biologie à Grande Echelle, Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, UJF/INSERM/CEA, Grenoble, France

¹Corresponding author: e-mail address: manuel.thery@cea.fr

Contents

1. Introduction	110
2. Micropatterned Substrates Fabrication	112
2.1 Designing features of micropatterns	114
2.2 Micropatterned slides manufacturing	116
3. Cells Plating on Micropatterned Slides	119
3.1 Cell culture	119
3.2 Cell synchronization (facultative)	119
3.3 Cell plating and serum starvation	121
4. Cell Fixation and Immunofluorescence	122
4.1 Cell fixation	123
4.2 Immunostaining	124
5. Automated Image Acquisition	124
6. Automated Image Analysis	125
6.1 Organelle detection on images	126
Acknowledgments	129
References	129

Abstract

The primary cilium is a biomechanical sensor plugged in at the cell surface. It is implicated in the processing of extracellular signals and its absence or malfunctioning lead to a broad variety of serious defects known as ciliopathies. Unfortunately, the precise mechanisms underlying primary cilium assembly and operation are still poorly understood. Molecular dynamics and intracellular morphogenesis are easier to study in cell culture than in tissues. However, cultured cells are usually nonciliated and the empirical methods that are used to induce ciliogenesis in these cells have variable efficiencies. In addition, these methods require cells to be cultured at high density, which is not convenient for further automated image analysis. Here, we describe a method to induce and modulate ciliogenesis in mammalian cells in culture that is compatible with

high-throughput imaging and analysis. Surface micropatterning is used to normalize cell shape and actin network architecture. In these conditions, the deprivation of growth factor induces ciliogenesis in individual single cells. The manipulation of cell-spreading area is used to modulate the proportion of ciliated cells. The manipulation of cell adhesion geometry is used to orient the position of the primary cilium. The spatial disposition of cells on a regular array offers a simple way to perform automated image acquisition. In addition, the regular cell shape is convenient to perform robust and automated image analysis to quantify the presence and location of primary cilia. This method offers a new way to study ciliogenesis in automated and high-throughput assays.



1. INTRODUCTION

The primary cilium is a microtubule-based hair-like antenna that projects from the surface of most quiescent mammalian cells. Numerous reports in the past decade have revealed that the primary cilium is a key biomechanical cell sensor implicated in major cell functions such as growth, polarization, and differentiation (Gerdes, Davis, & Katsanis, 2009). Although many recent studies have led to the identification of a large number of molecular players involved in primary cilium assembly and function, the actual mechanisms supporting these processes are still largely unknown (Garcia-Gonzalo & Reiter, 2012; Ishikawa & Marshall, 2011). Therefore, it is useful to investigate these basic principles in cultured cell *in vitro*, where cells are amenable to precise genetic, physical, and biochemical manipulations and observation. Later on, it will be possible to specifically investigate how the principles identified in cultured cells apply to cell functions in tissues and living animals.

Assembly of the primary cilium (known as ciliogenesis) can be induced in cultured cells. It depends on two main parameters. First, cells have to exit the cell cycle (Plotnikova, Golemis, & Pugacheva, 2008; Pugacheva, Jablonski, Hartman, Henske, & Golemis, 2007), and second, they have to be spatially confined (Alieva & Vorobjev, 2004; Wheatley, Feilen, Yin, & Wheatley, 1994). In some cell types, both parameters may be directly related, and cell cycle exit can be triggered by cell confluence. In others, cell cycle exit must be externally induced by the removal of growth factors from the culture medium. In both cases, the degree of confluency strongly affects the rate of ciliogenesis. Since it is difficult to precisely control this parameter in cultured cells, broad range of ciliogenesis rate has been reported for given cell types. This variability is somehow limiting the possibility to study the fine mechanism regulating ciliogenesis.

Here, we first describe a method to control individual cell spreading on micropatterned surfaces coated with extracellular matrix (ECM) (Fig. 6.1A) and then describe how these cells can be automatically recorded and analyzed. ECM micropatterns provide a reliable way to control cell shape and also offer the possibility to manipulate numerous processes involved at various stages of ciliogenesis. Indeed, the spatial distribution of cell adhesions constitutes the structural basis for the assembly of cell cytoskeleton, and thereby, it directs cell compartmentalization. Variations in the size and the shape of the cell adhesion pattern have been shown to finely modulate and orient actin network architecture, the spatial distribution of microtubules,

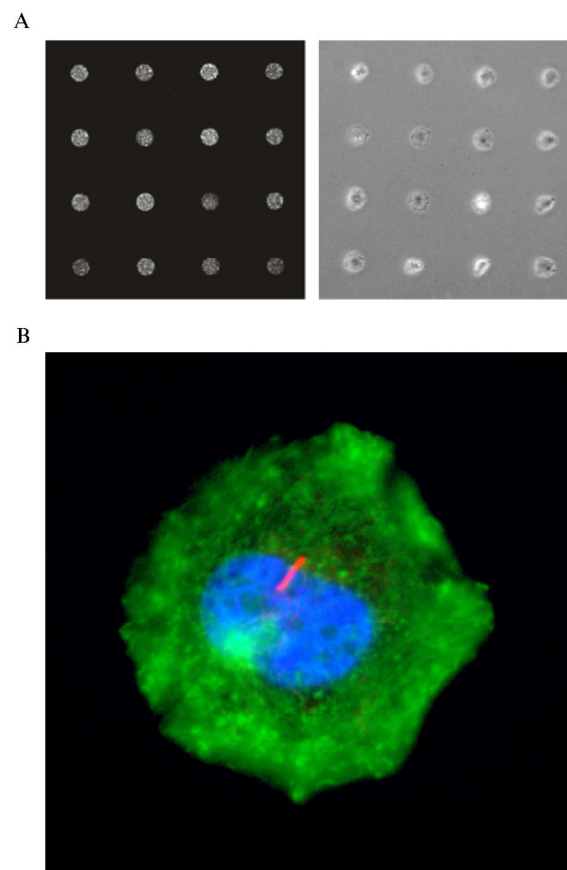


Figure 6.1 Array of ciliated single cells. (A) Array of fibronectin-coated micropatterns (left) on which individual RPE1 cells are confined (right). (B) Actin (green), nucleus (blue), and primary cilium (decorated with antibodies against acetylated tubulin, red) in a single cell confined on a $750\text{-}\mu\text{m}^2$ micropattern.

intracellular trafficking, cell polarization, cell division, and, in a less direct but still reliable way, cell differentiation (Théry, 2010). Ciliogenesis involving many of these structures and intracellular processes is also strongly modulated by cell adhesion pattern (Pitaval, Tseng, Bornens, & Théry, 2010). Most cells that are spatially confined on small micropatterns assemble a primary cilium on their dorsal surface (Fig. 6.1B). On the opposite extreme, cells that are extensively spread on large micropatterns cannot assemble a primary cilium although they have left the cell cycle. Variations in the degree of cell spreading results in variations in ciliogenesis rate (e.g., from 80% to 20% in RPE1 cells) as well as in the length of the primary cilium (from more than 5 μm in confined cells to less than 2 μm for the few cilia observed in spread cells) (Pitaval et al., 2010).

In addition to the control of ciliogenesis, micropatterned surfaces offer the possibility to automatize image acquisition, thanks to the predictable cell positioning on the regular array of micropatterns (Fig. 6.1A). They also facilitate image analysis, thanks to cell shape normalization. Here, we describe how classical motorized microscopes can be employed to perform a quantitative measurement and fine description of the various steps of ciliogenesis, notably the positioning of the basal body and the elongation of the primary cilium.



2. MICROPATTERNED SUBSTRATES FABRICATION

Several micropatterning methods have been developed to control cell adhesion, including photolithography (Guillou et al., 2008), microcontact printing (Quist, Pavlovic, & Oscarsson, 2005; Ruiz & Chen, 2007), or photopatterning (Azioune, Storch, Bornens, Théry, & Piel, 2009; Kaneko et al., 2011). After testing most of them, we concluded that deep-UV patterning (Azioune, Carpi, Tseng, Théry, & Piel, 2010) was the most efficient and easiest to install in any laboratory without numerous dedicated equipment or specific know-how. It is relatively fast (less than 2 h) and based on commercially available products. It offers a reproducible protein grafting on the micropatterned regions and a highly repellent coating around them. Here, we not only describe the complete microfabrication protocol (Fig. 6.2) but also suggest some commercial alternatives to circumvent some of the steps requiring specific and costly equipment. The simplest alternative is to order micropatterned glass slides from dedicated companies (Cytoo, France).

Required materials and equipment

- Quartz Photomask (Toppan Photomask, DeltaMask)
- Glass coverslips

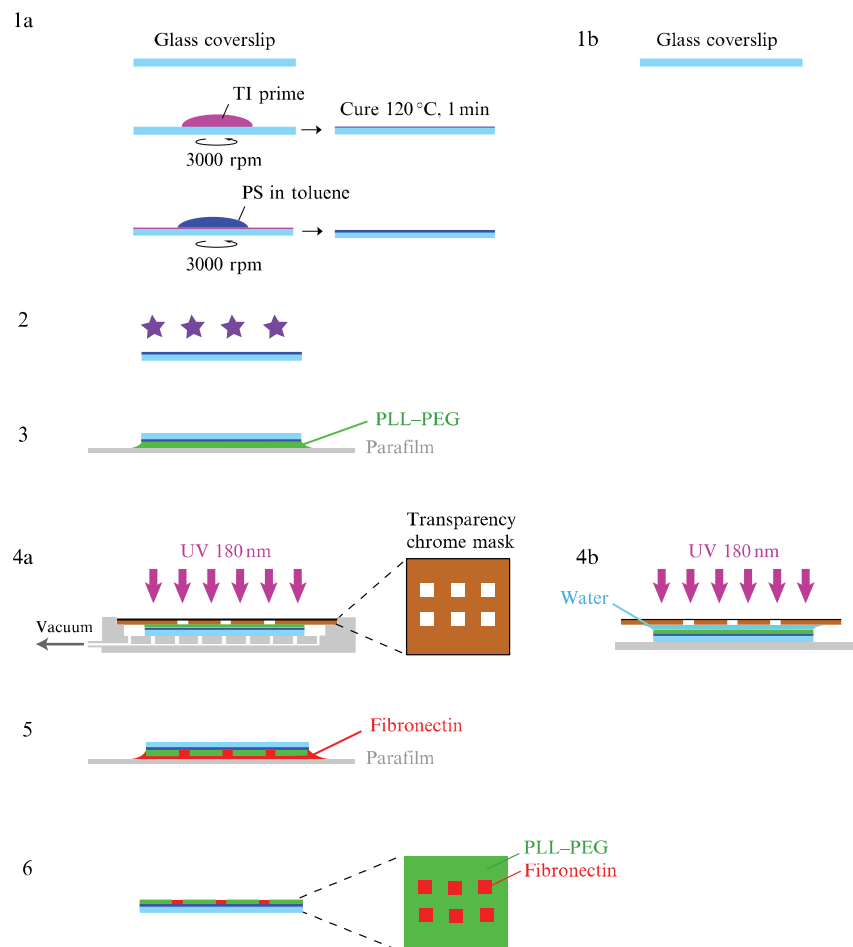


Figure 6.2 Surface micropatterning. Steps 1a and 1b are two alternatives. Step 1a illustrates glass slide coating with a thin layer of polystyrene (PS), whereas step 1b illustrates the use of a bare glass slide. Step 2 illustrates slide activation by exposition to oxygen plasma (or deep UV). Step 3 shows how to lay upside down the activated slide on a polylysine–polyethylene glycol (PLL–PEG) solution. Steps 4a and 4b are two alternatives. Step 4a shows vacuum-induced contact between the photomask and the pegylated slide with a homemade mask holder. Step 4b shows capillarity-induced contact between the photomask and the pegylated slide with a water drop. Step 5 shows how to lay upside down the micropatterned slide on a fibronectin/fibrinogen solution. Step 6 shows the final result after rinsing.

- Phosphate-buffered saline (PBS +/+) (Invitrogen, Gibco ref 14040-091)
- PLL(20)-g[3.6]-PEG(2) (Surface Solutions, Switzerland) (stock solution at 1 mg/ml in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4)
- Isopropanol
- Acetone
- Ethanol 96%
- UV ozone cleaner (e.g., UVO cleaner Jelight ref 342-220 or Heraeus Noblelight GmbH ref NIQ 60/35 XL longlife lamp, $\lambda = 185$ and 254 nm, quartz tube, 60 W)
- Fibronectin (Sigma F1141) or other ECM
- Alexa Fluor 647 human fibrinogen conjugate (Invitrogen ref F35200)

Facultative materials and equipment

- Software for designing micropattern features (L-edit, Cadence, or Clewin) (facultative)
- Plasma cleaner (PDC-32G, Harrick) (facultative)
- Spin coater (WS-400-6NPP-LITE Laurell Technologies Corporation) (facultative)
- TI Prime (MicroChemicals) (facultative)
- Hot plate (facultative)
- 1% Polystyrene (178890250, ACROS Organics) dissolved in toluene (facultative)
- Homemade vacuum mask holder (facultative)
- Filtered airflow (facultative)

2.1. Designing features of micropatterns

Several softwares can be used to design micropatterns. Like many drawing software, they record the graph coordinates. Using elementary drawing tools, you can draw any shape of interest and then duplicate that shape on a regular array. The final file has then to be exported in a specific format either CIF or GDSII. Such file format can then be used by the photomask manufacturer to direct an e-beam to physically draw the shapes and remove the thin chromium layer lying on a 5-mm-thick quartz plate. Usually, photomask manufacturers can also draw themselves your micropattern in their dedicated softwares in order to convert your manual or schematic drawing into a GDSII or CIF files (additional cost has to be foreseen).

The efficacy of the micropatterned slides to normalize cell phenotypes depends on three key micropattern features: the micropattern size, shape, and the step between them.

The right micropattern size depends on cell type and on the observed phenotypes. In frequent cases, micropatterns are used to normalize and observe cell internal organization. The cell “body plan” is easier to visualize in 2D and simpler to quantify with basic (but robust) image analysis procedures when cells are as spread as possible. It is therefore necessary to find the largest area cells can spread on. However, when the area is too large, cells can move on the micropattern and adopt different shapes from one micropattern to the other. This would result in a loss of cell normalization. The right spreading area for observation of internal cell organization in 2D is thus the largest spreading area that can be fully covered by more than 90% of the cells. The right micropattern size for most cell types is between 500 and 1500 μm^2 . Most epithelial cells such as MCF10A, MDCK need to be plated on small micropatterns about 500 μm^2 . Most fibroblasts such as NIH3T3 require larger micropattern sizes around 1500 μm^2 . However, some cell types such as embryonic fibroblast can require much larger areas (up to 10,000 μm^2). Importantly, it should be noted that, contrary to the above example, the right micropattern size to induce ciliogenesis is not the one allowing the largest spreading area but on the opposite it should confine cells on small adhesive regions.

The right micropattern shape also depends on the observed phenotype. In most cases, such as the one studied here, a simple disc is sufficient to normalize cell shape and define a basal-like adhesive ventral surface and an apical-like nonadhesive dorsal surface (Pitaval et al., 2010). Asymmetric geometries such as pac-man or crossbow-shaped micropatterns force the cells to spread upon adhesive and nonadhesive regions. This will induce distinct organization of the actin network, mainly stress fibers above nonadhesive regions and dense and branched polymerizing filaments above adhesive regions. The respective locations of these two types of actin-based structures bias the planar cell symmetry and orient cell polarity (centrosome–nucleus axis as well as internal traffic) in the adhesion plane (James, Goluch, Hu, Liu, & Mrksich, 2008; Schauer et al., 2010; Théry et al., 2006). This orientation can result in a more normalized internal architecture since cells receive spatial information not only along the Z axis but also in the XY plane.

The right distance between the micropatterns depends on cell ability to generate membrane protrusions and contact adjacent micropatterns, which is something that should be avoided. Epithelial cell types appeared to be less efficient than fibroblasts in this distant spatial exploration, so they could be disposed on a dense array with smaller steps in between micropatterns. As a rule of thumb, impose at least one cell diameter in between two

micropatterns. Most often a distance of 100 μm is sufficient to prevent all types of cell–cell interactions or bridges in between the micropatterns. It is convenient to use the same interpattern distance for all mask designs in order to apply the same automatized image acquisition procedures for all conditions (see below).

Finally, it should be noted that one can easily get lost while moving the sample on the stage microscope and looking at the cell array. Visible marks can facilitate cell location appreciation. For example, replacing every 10 rows and columns of micropatterns by large adhesive bars defines a square working area of 100 micropatterns, the size of which fits with the observation field of a $10\times$ objective.

2.2. Micropatterned slides manufacturing

This step consists in coating a glass slide with a cytophobic polymer (that prevents protein adsorption and cell attachment) and locally destroying this polymer to allow protein and cell adhesion. Poly(ethylene-glycol) (PEG) has proven to be a very efficient cytophobic polymer which generates a water solvation layer preventing protein access to the underlying surface. The use of a copolymer made of a backbone of polylysine (PLL) with PEG side chains is very convenient to graft PEG chains on a negatively charged surface using the positive charges of the PLL (Heuberger, Drobek, & Spencer, 2005). Contrary to most PEG functionalization protocols, the use of PLL–PEG circumvents the need to control sensitive chemical reactions such as the ones involved in silanization, for example. PLL–PEG can adsorb on negatively charged surface in a few minutes in aqueous solution. PEG chains can then be locally oxidized in various ways in order to destroy their conformation and water solvation properties. Here, we describe the use of surface exposure to deep UV light through an optical mask. The exact effect of UV-generated ozone on PEG chain is not clear, but the consequence is that proteins can then adsorb on the exposed regions. All these steps can be performed on bare glass slides. Our experience revealed that a precoating of the glass slide with a thin layer of polystyrene (PS) improved protein adsorption of the UV-exposed regions. But this is a facultative step that, although easy to perform, can be ignored by those who do not have access to a spin coater.

2.2.1 PS coating

This step is not critical but can be used to improve protein and cell adhesion on the micropatterns (Fig. 6.2-1a) compared to bare glass (Fig. 6.2-1b).

1. Wash the glass coverslips (20 mm × 20 mm) with ethanol 96% and dry them with filtered airflow or let them dry under a hood.
 2. Put a coverslip on the spin coater, cover it with TI prime and spin it for 30 s at 3000 rpm.
 3. Bake the coverslip at 120 °C for 2 min on a hot plate.
 4. Put the coverslip back on the spin coater, cover it with the 1% PS solution, and spin it for 30 s at 1000 rpm. Toluene will evaporate immediately.
- PS-coated slides can be stored at room temperature.

2.2.2 PLL-g-PEG coating

1. The PS-coated slides should then be exposed to oxygen plasma for 30 s at 30 W (Fig. 6.2-2). Alternatively, for those who do not have access to a plasma generator, PS-coated slides can be exposed to the lamp-generating deep UV for 2 min. Glass slides without the PS coating can also be exposed either to oxygen plasma (2 min at 100 W) or deep UV (10 min).
2. The slides are then incubated with PLL-g-PEG at 0.1 mg/ml in 10 mM HEPES (pH = 7.4) at room temperature for 30 min. To spare reagents, it is possible to put a 100 µl PLL-PEG droplet on a parafilm and place the slide on top of it (the oxidized side of the slide should face the droplet) (Fig. 6.2-3).
3. Slowly lift off the coverslip to ensure complete PLL-g-PEG solution dewetting. Do not rinse it. Remove the last drop of PLL-g-PEG on the slide edges with kimwipes or gentle airflow.

Pegylated coverslips can be stored at 4 °C for 1 week.

2.2.3 Surface patterning

Place the UV ozone cleaner under a chemical hood because of ozone production.

1. Switch on the UV ozone cleaner (or deep UV light) for 10 min before using in order to warm the lamp and work with a reproducible amount of UV.
2. Clean the photomask with acetone to remove organic residues and then with isopropanol to remove inorganic residues and acetone traces.
3. Dry the photomask with filtered airflow.

It is crucial to create an intimate contact between the slide and the mask. This can be achieved either by using a dedicated mask holder in which the vacuum is used to press the slides onto the mask (Fig. 6.2-4a) or by simply using the capillary force of water to stick the slide to the mask (Fig. 6.2-4b). Here are described the two possibilities:

The vacuum mask holder is a plate (larger than the mask) with holes through which the vacuum is applied.

4. Slides are placed on this plate and covered with the mask; the pegylated side of the slides should face the chromium side of the mask. The vacuum is open to aspirate the mask onto the slides, which are now pressed between the mask and the plate (Fig. 6.2-4a).
5. The sandwich is placed in the UV ozone cleaner and exposed to deep UV for 2 min at about 5 cm from the lamp.
6. Switch off the vacuum and separate the plate and the mask. Detach cautiously the coverslips from the mask. Special care must be taken at this step in order not to damage the chromium layer on the mask. A plastic micropipette can be used to lift up the coverslip. Do not use metallic tweezers. The vacuum can also be used to aspirate the slides and detach them from the mask without using any tweezer. Switch to step 7.

For those who cannot manufacture their own mask holder, it is possible to use a water drop.

4. Place the pegylated side of the coverslip in contact with the chrome-coated side of the photomask with a drop of water (for a 20-mm coverslip, use a drop of 1.5 μ l of water on the mask). Formation of air bubbles must be prevented (Fig. 6.2-4b).
5. The sandwich is placed in the UV ozone cleaner and exposed to deep UV for 2 min at about 5 cm from the lamp.
6. Detach cautiously the coverslips from the mask. Special care must be taken at this step in order not to damage the chromium layer on the mask. Add water around the slide and wait until it is lifted up. Do not use a metallic tweezers.
7. Incubate the coverslips with PBS during 10 min to induce PEG chains swelling before the protein coating step. Note that when removing the slide from the PBS, it is now possible to observe the micropatterned regions during water dewetting. It is a good sign of experimental success.
8. Incubate the micropatterned slides with the fibronectin solution (Fibronectin at 25 μ g/ml and Alexa647-Fibrinogen at 10 μ g/ml in PBS) for 30 min at room temperature (Fig. 6.2-5). Avoid longer incubation time since it would result in protein background out of the micropatterned regions. To spare fibronectin solution, it is possible to put a 100- μ l droplet on a parafilm and place the micropatterned slide on top of it (the micropatterned side of the slide should face the droplet).
9. Rinse with PBS and check on the microscope for the specific grafting of fluorescent proteins on the micropatterns (Fig. 6.2-6).



3. CELLS PLATING ON MICROPATTERNED SLIDES

Here, we describe how to culture immortalized human retinal pigment epithelial (RPE1) cells, plate them on micropatterns, and then starve them in order to induce their ciliogenesis while they are attached on and therefore normalized by the micropattern.

Required materials and equipment

- hTert-RPE1 (CRL-4000, ATCC)
- Phosphate-buffered saline (PBS +/+) (14040-091, Invitrogen Gibco)
- Trypsin–EDTA (0.25%) in HBSS without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (25300-054, Invitrogen Gibco)
- Thymidine (T1895, Sigma–Aldrich)
- Growth medium: DMEM/F12 (31331, Invitrogen Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin.
- Assay medium: DMEM/F12 (31331, Invitrogen Gibco) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (no serum).

3.1. Cell culture

The protocol has been established for human telomerase-immortalized retinal-pigmented epithelial cells (hTERT-RPE1), which is an appropriate model to study ciliogenesis since this cell type is actually ciliated in the retina where they form a thin monolayer as they do in culture. RPE1 are not transformed and they conserved their contact inhibition properties as well as the checkpoints for cell cycle progression.

hTERT-RPE1 can be grown in DMEM/F12 medium according to classical cell culture practices. Noteworthy, it is important to prevent the cells from reaching confluence. The reasons are not well known, but the consequence is a significant reduction of primary cilium incidence upon serum starvation in the following experiments. Therefore, it is necessary to check regularly for their ciliogenesis capacities by plating them at high density, starving them for 24 h once they reached confluence, and revealing their cilia with an immunostaining against acetylated tubulin (see below).

3.2. Cell synchronization (facultative)

RPE1 cells ability to exit cell cycle in response to serum starvation depends on their position in the cell cycle ([Pitaval et al., 2010](#)). Cells that are in early G1 when the serum is removed exit the cell cycle straight away. Cells that are

anywhere else in the cycle are committed to division although growth factors have been removed. They keep on progressing through the cell cycle until they divide. Right after division, daughter cells are in early G1. They can now exit the cell cycle and enter the ciliogenesis process. On micropattern, this latter scenario would be a matter of concern since micropatterns would be occupied by pairs of daughter cells rather than by a single cell, which is a requisite for cell phenotype normalization by cell shape control. Therefore, it is useful to synchronize cell cycles in order to plate cells in early G1 and obtain a maximum incidence of single ciliated cells. To this end, we performed a double thymidine block. *But it should be noted that cell synchronization is facultative* and performed here to increase the proportion of isolated ciliated cells on micropattern.

Start the procedure at the end of your working day in order to perform the blocking steps overnight and obtain cells ready to be released in the morning.

1. End of day 1: Remove the culture medium of a 75-cm² flask in which cells are about 40% of confluence.
2. Add 12 ml of prewarmed growth medium and 600 µl of thymidine at 100 mM (in order to induce a final thymidine concentration of 5 mM). This excess of thymidine with respect to the other nucleotides induces a feedback inhibition of DNA synthesis that blocks cells that are in S phase.
3. Keep the flask in the incubator for 16 h. Cells that were not in S phase when thymidine has been added progress through the cell cycle and become blocked at the G1/S transition.
4. Beginning of day 2: Remove the medium and wash cells twice with warmed PBS+/+ for 5 min to remove thymidine excess.
5. Add new prewarmed growth medium. The G1/S block is released and cells can progress through S phase. Cells synchrony is not optimal since released cells are at various stages in the 2-h-long S phase.
6. Keep the flask in the incubator for 8 h.
7. End of day 2: Remove the culture medium and add 12 ml of prewarmed growth medium with 600 µl of thymidine at 100 mM (in order to induce a final thymidine concentration of 5 mM).
8. Keep the flask in the incubator for 16 h. All cells will progress through the cell cycle and become blocked at the G1/S transition.
9. Beginning of day 3: Add new prewarmed growth medium. The G1/S block is released and cells can progress through S phase. Cells are now well synchronized.

10. Keep the flask in the incubator for 10 h. During this period, cells will progress through S, G2, and M phase and enter the G1 phase.
11. End of day 3 (which will be a long working day): There are still many round cells in mitosis at this step. It is, however, necessary to perform this step now to make sure that cells that went through mitosis already will not have time to progress too far in the G1 phase. Shake off the mitotic cells and remove culture medium to get rid of them. Detach and plate the cells on the micropatterned slide.

Note that this synchronization procedure is quite long and impose a 12-h-long working day during which cells are released from the G1/S block in the morning, collected in early G1 10 h later to start a 1-h-long plating procedure on the micropatterned slide. Alternatively, it might be convenient to use a Cdk1 inhibitor (RO-3306) in order to block cells at the G2/M transition in a single-step protocol ([Vassilev, 2006](#)) and obtain cells in early G1 earlier in the working day. However, we did not have the opportunity to test it on RPE1 cells.

3.3. Cell plating and serum starvation

This step is critical since it will define the rate of micropattern occupancy by single cells and therefore the number of exploitable cells per condition. Plating too many cells would result in aggregation of several cells per micropattern preventing cell analysis. Plating too few cells would result in single cell occupancy but few measurements. The best procedure to obtain high occupancy rate is to plate many cells and wash them before they could all attach to the micropattern.

Serum starvation will be performed once the cells are spread onto the micropattern. Indeed, resuspending cells in the medium without serum and plating them on the micropattern in this medium would promote their attachment out of the micropatterned regions. Serum starvation induces a short-term cell response in which actin dynamics is modified. In these conditions, cells can spread without much adhesion to the substrate. It is therefore preferable to plate cells in serum-containing medium and switch the medium once the cells are confined on their micropatterns.

1. Immerse the micropatterned slide in PBS for 10 min in a Petri dish.
2. Aspirate the PBS and plate about 10,000 cells/cm² in growth medium (roughly 100,000 cells for a 35-mm round Petri dish).

Cell adhesion on micropatterned slides is longer than on classical Petri dish. A consequence is that, large volumes, in which temperature

changes induce fluid convection, promote floating cell aggregation at the dish center, whereas in small volume, cells move less and attach uniformly all over the slide. So the optimal volume to plate cells should be as small as possible (1 ml for a 35-mm round Petri dish).

3. 30 min after plating: Check on the microscope that cells have started to spread on micropatterns. If the number of attached cells is sufficient, remove the floating cells by gently aspirating the medium with a pipetman mounted with a 1-ml tip on one side of the dish while adding some new medium on the other. Do not use vacuum-based aspiration. Indeed, a strong aspiration could induce a complete medium dewetting (due to PEG physicochemical properties) and dry cell to death.
4. Put the cells back in the incubator for 1 h so that they have to complete their spreading.
5. Aspirate the growth medium with a pipetman mounted with a 1-ml tip and add 2 ml of the assay medium (without fetal calf serum).
6. Put the cells back in the incubator for 24–48 h.



4. CELL FIXATION AND IMMUNOFLOUORESCENCE

Primary cilia are thin tubular structures protruding out of the cells. Therefore, they could be easily cut or damaged during fixation. Methanol fixation, for example, is based on the substitution of water by alcohol. It involves fast and violent liquids exchange, which can detach some of the primary cilia. Formaldehyde fixation preserves cilia but does not systematically preserve antigen immunogenicity. We found that fixation with a mix of acetone and methanol preserves cilia and as well as cilia- and basal body-associated antigens immunogenicity (Fig. 6.3).

Required materials and equipment

Methyl alcohol (414814, Carlo Era)
 Acetone (32201, Sigma–Aldrich)
 BSA 1.5% powder (A9647, Sigma–Aldrich)
 Mouse Acetylated tubulin (T7451, Sigma–Aldrich)
 Rabbit Gamma tubulin (ab11317, Abcam)
 Cy3-conjugated goat anti-mouse (115-165-146, Jackson ImmunoResearch)
 488 Alexa-conjugated goat anti-rabbit (111-485-045, Jackson ImmunoResearch)
 Hoechst 33342 solution at 2 mg/ml (62249, ThermoScientific)

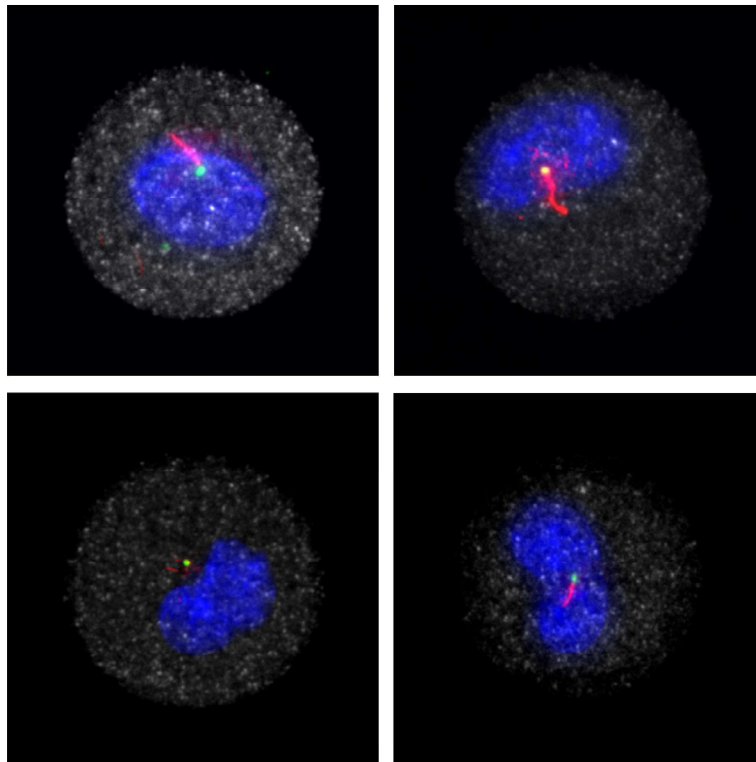


Figure 6.3 Primary cilium staining. Images show basal body and primary cilium immune-stainings with antibodies against gamma tubulin (green) and acetylated tubulin (red), respectively. A large majority (60–80%) of single RPE1 cells confined on 750- μ m² micropattern (gray) are ciliated.

Antifade mounting medium (Mowiol, Sigma–Aldrich)

Microscope slide

4.1. Cell fixation

During this step, as well as during medium switching after cell plating, care should be taken not to induce medium dewetting and cell drying.

1. Prepare a methanol/acetone solution (1/1) and keep it at -20°C for few hours.
2. Do not wash the slide with PBS prior to cell fixation. Aspirate gently the medium with a pipette in the corner. Add quickly 2 ml of cold methanol/acetone solution in the corner and not directly on the slide.
3. Rotate gently the dish and keep it at -20°C for 5 min.
4. Wash twice in PBS.

4.2. Immunostaining

Fixed cells are preincubated with BSA in order to reduce nonspecific antibodies adsorption and fluorescence background. Primary antibodies directed against acetylated and gamma tubulin must be added successively.

Blocking

1. Incubate cells with a 1.5% BSA solution in PBS (filtered through 0.22- μ m filters) for 30 min.

Primary antibodies

2. Incubate cells with mouse antibodies against acetylated tubulin (1/10,000 dilution with 1.5% BSA in PBS) for 1 h at room temperature.
3. Rinse with PBS.
4. Incubate cells with rabbit antibodies against gamma tubulin (1/2000 dilution with 1.5% BSA in PBS) for 1 h at room temperature.
5. Rinse with PBS.

Secondary antibodies

6. Incubate cells with Cy3-conjugated goat anti-mouse and Alexa488-conjugated goat anti-rabbit diluted (1/500 dilution for each in 1.5% BSA in PBS) for 45 min at room temperature in the dark.
7. Rinse with PBS.
8. Incubate cells in Hoechst solution at 0.2 mg/ml in PBS for 10 min.
9. Rinse with PBS.
10. Place the slide on a microscope slide with an antifading mounting medium (20 μ l of Mowiol). The slides can be stored several weeks at 4 °C and several months at -20 °C.



5. AUTOMATED IMAGE ACQUISITION

Cell arrays are particularly convenient for automated high-magnification image acquisition of single cells (Fig. 6.1A). It simply requires the estimation of the angular tilt between the cell array and the stage axes. The columns and rows of the cell array are then scanned automatically after calibration of the XY steps for the motorized stage. Since the automated acquisition of four color-Z-stacks at each position of the array could be quite long and inefficient considering that many micropatterns contains no cell or several cells, a preanalysis is made to count nuclei and acquire image of single cells only.

Required materials and equipment

Motorized upright microscope equipped with a motorized XY stage (BX71, Olympus)

CCD camera (HQ2, Roper Scientific)

100 \times oil objective (Plan Apo, Olympus)

Piezoelectric ceramic for fast objective displacements along the *Z* axis (Physics Instruments)

Image acquisition and device monitoring software (Metamorph, Molecular Devices)

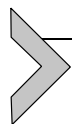
Journals for automated acquisition (see supplementary files, <http://www.elsevierdirect.com/companions/9780123979445>) (Metamorph, Molecular Devices)

Calibration of cell array scanning

1. Run the journal and specify the number of rows and columns.
2. Move the stage and record/enter the position of three corners of the array. Using these coordinates, the journal will estimate the angular tilt and the exact positions of all micropatterns.

Images acquisition

3. At each position, the journal first uses the plugin “autofocus software” to find the optimal focus for the micropattern based on the contrast of Alexa657-fibrinogen fluorescence signal.
4. Z-stack in the blue channel is recorded and the number of nuclei is determined using “Metamorph Integrated Morphometry Analysis.” The size and area of detected object are compared to preregistered value to test whether they can be considered as a nucleus.
5. If one single nucleus is detected, z-stacks (11 planes separated by 1 μm) are acquired and saved for all fluorescence channels. Otherwise, the stage moves to the next micropattern position.



6. AUTOMATED IMAGE ANALYSIS

Automated image analyses are usually sophisticated procedures in which the first major hurdle is the detection of cell boundaries. Here, it is not necessary since automated acquisition has been limited to single cell only. The second hurdle is usually in the use of spatial references to calculate the coordinates of intracellular compartments. Here, the reference axes are defined by the micropattern geometry. As illustrated in two examples, the automated quantification provides fast and reliable quantifications of ciliogenesis rates as well as positions of primary cilia.

Required materials and equipment

- ImageJ (National Institute of Health: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)
- Plugins included in the Fiji package (<http://fiji.sc>)

- “Template Matching” plugin (sites: <https://sites.google.com/site/gingzongtseng/template-matching-ij-plugin>)
- Nucleus-centrosome detection plugin (<http://www.elsevierdirect.com/companions/9780123979445>)

Image processing

1. Z-stacks of all channels were projected into a single plane.
2. Projections were merged into a composite image, and all composite images were combined into a composite image stack (hyperstack).
3. All micropatterns (and therefore all cells) of this hyperstack were not perfectly aligned. Their displacements with respect to a reference micropattern were calculated using the custom written “Template Matching” plugin. All channels were automatically corrected for the same displacement as the one calculated for the micropattern.

6.1. Organelle detection on images

Cells sometimes contain several bright spots in the centrosome or cilium fluorescence channels. However, usually only one large gamma tubulin dot is positioned above, below, or very close to the nucleus. Our strategy is to detect the nucleus first, to search for the centrosome close to nucleus boundaries, and then to search for the primary cilium in contact with the centrosome (Fig. 6.4).

1. Run the plugin and define a “best value” for nucleus size and circularity. The macro then selects the nuclei channel, filters the imager with a “mexican hat” function (Sage, Neumann, Hediger, Gasser, & Unser, 2005), applies an automatic threshold (Kapur, Sahoo, & Wong, 1985), binarizes the image, creates a mask, and runs the “analyze particle” ImageJ plugin to store the outline of each nucleus in Image J’s ROI Manager (Fig. 6.4). If no nucleus is detected, the macro lowers the threshold prior to binarization. If visual inspection reveals that the automatically detected outline is not correct, it is possible to change and save it manually.
2. Centrosome size and circularity have to be predefined within the macro code. The macro then selects the centrosome channel, filters the image with a “mexican hat” function (Sage et al., 2005), applies an automatic threshold (Kapur et al., 1985), and binarizes the image. The macro imports the nucleus ROI list and searches for a spot of the right size and circularity in a region slightly larger than the nucleus contour. Centrosome and satellites or dusts may both be detected. If more than two particles are detected, the contour is progressively reduced until only a single particle is detected (Fig. 6.4).

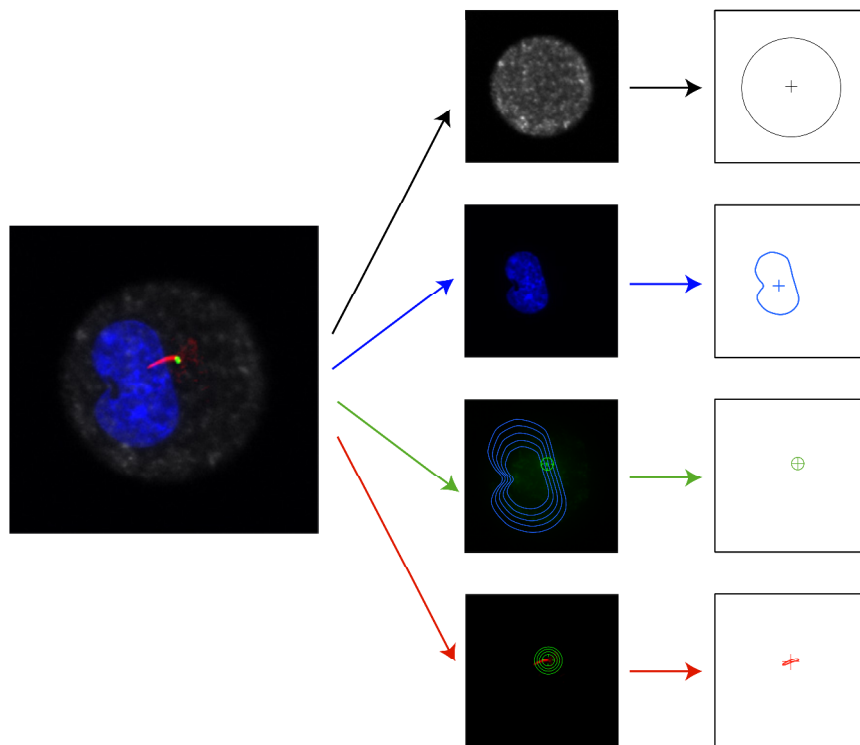


Figure 6.4 Automated image analysis. A basic fluorescence threshold is used to detect the micropattern and calculate the coordinate of its center (top row). Nucleus image filtering and thresholding are used to detect and record nucleus boundaries as well as nucleus center (second row). Nucleus boundaries are reported on the centrosome image to first look for a bright spot in these boundaries and, if not successful, progressively increase the size of these boundaries until the centrosome is detected (third row). Finally, the centrosome position is used to look for intense primary cilium in its vicinity (bottom row).

3. The macro then uses the nuclei/centrosome ROI list to search for a strong signal around the detected centrosome in order to detect the primary cilium (Fig. 6.4).

Quantification of organelle positions

1. The detection of cilia is directly used to calculate the proportion of ciliated cells. Thereby, it is possible to detect any effect due to cell geometry (Fig. 6.5A) or gene-product silencing by siRNA (not shown) on ciliogenesis.
2. In the global table containing organelle position for each cell, lines corresponding to nonciliated cells are ignored.

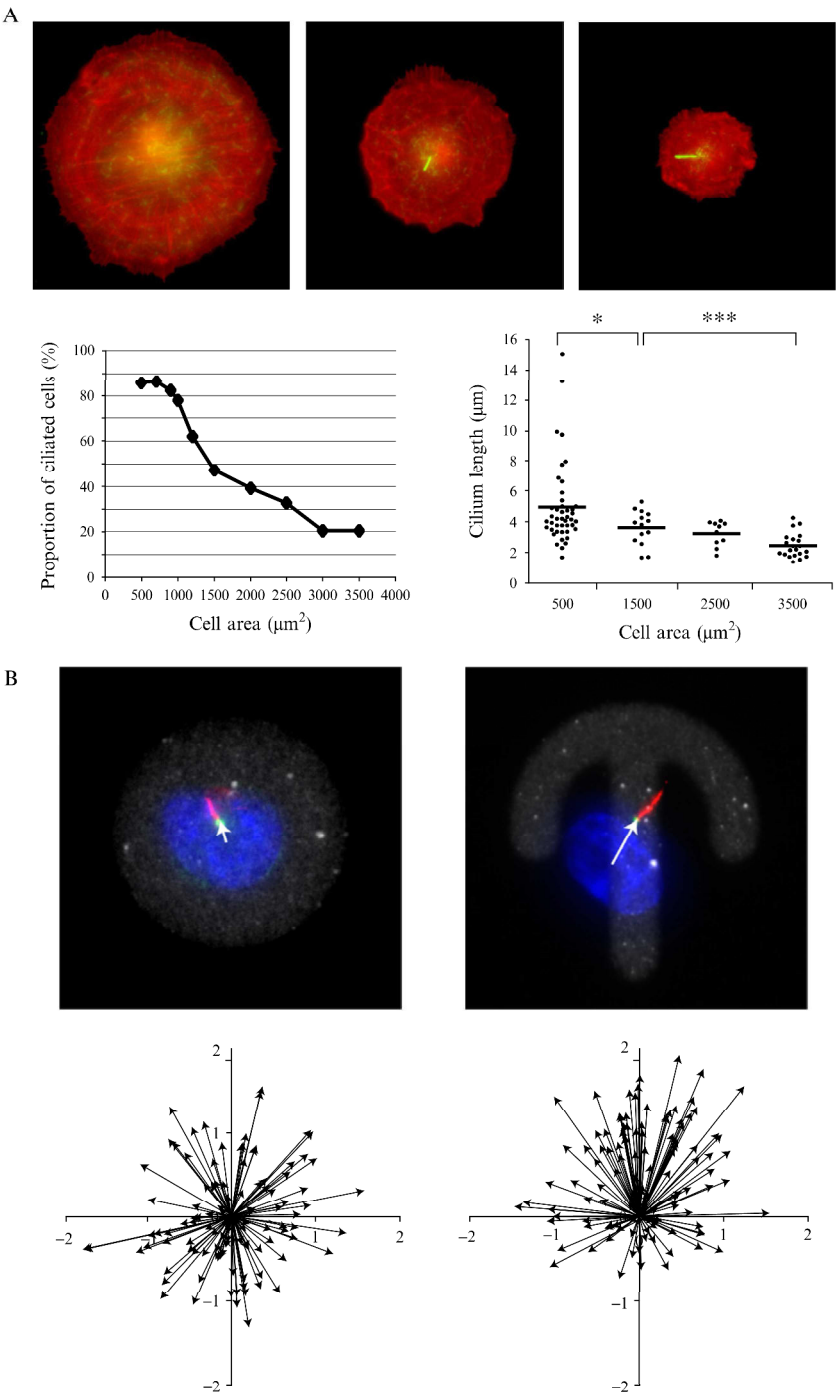


Figure 6.5 Ciliogenesis rate and cilium position analysis. (A) Illustration of the reduced rate of ciliogenesis and length of the primary cilium in spread cells compared to confined cells. (B) Quantification of basal body positioning, with respect to the nucleus, in ciliated cells on disc-shaped and crossbow-shaped micropatterns. The asymmetry of the crossbow biased the orientation of the nucleus centrosome vector in the adhesion plane. Adapted from [Pitaval et al. \(2010\)](#).

3. The coordinates of the nucleus-centrosome vector are calculated by subtracting nucleus coordinates to centrosome coordinates (Fig. 6.5B). This vector indicates the orientation of the internal cell polarity and notably the preferential direction for the internal traffic toward the primary cilium. It appeared to depend on the geometry of cell shape and the spatial distribution of cell adhesion (Fig. 6.5B) as it was also the case for nonciliated cells ([Théry et al., 2006](#)).

ACKNOWLEDGMENTS

Research in M. T.'s laboratory is supported by the OSEO program for Industrial Strategic Innovation (ISI) and by the Human Frontier Science Program for young investigators (RGY0088/2012).

REFERENCES

- Alieva, I. B., & Vorobjev, I. A. (2004). Vertebrate primary cilia: A sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a "sleeping beauty" in cultured cells? *Cell Biology International*, 28, 139–150.
- Azioune, A., Carpi, N., Tseng, Q., Théry, M., & Piel, M. (2010). Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs. *Methods in Cell Biology*, 97, 133–146.
- Azioune, A., Storch, M., Bornens, M., Théry, M., & Piel, M. (2009). Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a Chip*, 9, 1640–1642.
- Garcia-Gonzalo, F. R., & Reiter, J. F. (2012). Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *The Journal of Cell Biology*, 197, 697–709.
- Gerdes, J. M., Davis, E. E., & Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, 137, 32–45.
- Guillou, H., Deprez-Depland, A., Planus, E., Vianay, B., Chaussy, J., Grichine, A., et al. (2008). Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Experimental Cell Research*, 314, 478–488.
- Heuberger, M., Drobek, T., & Spencer, N. D. (2005). Interaction forces and morphology of a protein-resistant poly(ethylene glycol) layer. *Biophysical Journal*, 88, 495–504.
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 222–234.
- James, J., Goluch, E. D., Hu, H., Liu, C., & Mrksich, M. (2008). Subcellular curvature at the perimeter of micropatterned cells influences lamellipodial distribution and cell polarity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 65, 841–852.

- Kaneko, S., Nakayama, H., Yoshino, Y., Fushimi, D., Yamaguchi, K., Horiike, Y., et al. (2011). Photocontrol of cell adhesion on amino-bearing surfaces by reversible conjugation of poly(ethylene glycol) via a photocleavable linker. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 4051–4059.
- Kapur, J. N., Sahoo, P. K., & Wong, A. K. C. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics and Image Processing*, 29, 273–285.
- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., & Théry, M. (2010). Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of Cell Biology*, 191, 303–312.
- Plotnikova, O. V., Golemis, E. A., & Pugacheva, E. N. (2008). Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Research*, 68, 2058–2061.
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P., & Golemis, E. A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 129, 1351–1363.
- Quist, A. P., Pavlovic, E., & Oscarsson, S. (2005). Recent advances in microcontact printing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 591–600.
- Ruiz, S. A., & Chen, C. S. (2007). Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter*, 3, 168–177.
- Sage, D., Neumann, F. R., Hediger, F., Gasser, S. M., & Unser, M. (2005). Automatic tracking of individual fluorescence particles: Application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14, 1372–1383.
- Schauer, K., Duong, T., Bleakley, K., Bardin, S., Bornens, M., & Goud, B. (2010). Probabilistic density maps to study global endomembrane organization. *Nature Methods*, 7, 560–566.
- Théry, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, 123, 4201–4213.
- Théry, M., Racine, V., Piel, M., Pépin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., et al. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19771–19776.
- Vassilev, L. T. (2006). Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell cycle*, 22, 2555–2556.
- Wheatley, D. N., Feilen, E. M., Yin, Z., & Wheatley, S. P. (1994). Primary cilia in cultured mammalian cells: Detection with an antibody against dephosphorylated alpha-tubulin (ID5) and by electron microscopy. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 26, 91–102.

ABREVIATIONS

ACF7 : (ATP dependent chromatin assembly and remodelling factor 7
actine F : actine filamenteuse
ADN : acide désoxyribonucléique
APC : anaphase promoting complex
aPKC : atypical protein kinase C
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BBS : Bardet-Biedl syndrome
C. elegans : Caenorhabditis elegans
Cc2d2a : coiled coil and C2 domain-containing 2A
CCDC41 : Coiled coil domain containing 41
DAV : distal appendages vesicles
CDK2 : cyclin-dependant kinase 2
Cdk1 : cyclin-dependant kinase 1
CEP : centrosomal protein
CLASPs : cytoplasmic linker protein-associated proteins
C2CD3 : C2 calcium-dependent domain containing 3
DZIP1 : DAZ-interacting zinc finger protein 1
Protéine EB : end-binding protein
ERK7 : Extracellular signal Regulated Kinase
ERM : Ezrine Radixine Moésine
FAK : focal adhesion kinase
FBF1 : Fas (TNFRSF6) binding factor 1
FGF : Fibroblast Growth Factor
FoxJ1 : Forkhead box J1)
HDAC6 : histone deacetylase 6
HEF1 : Enhancer of Filamentation 1
HeLa : lignée provenant de Mme Henrietta Lacks (cancer cervical)
HNF1 β : hepatocyte nuclear factor 1 β
hTERT-RPE1 : human retinal pigmented epithelial cells
GPCRs : récepteurs couplés aux protéines G
Hh : Hedgehog
IFT : Intra Flagellar Transport
ILK : integrin linked kinase
iMDC3 : inner medullary collecting duct cell line
JBTS : Joubert syndrome
KASH : Klarsicht/ANC-1/Syne homology
Kif3a : Kinesin family member 3
LCA : Leber congenital amaurosis
LINC : linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton

LGN : leucine-Glycine-asparagine repeat protein
 LPA : acide lysophosphatidique
 MAPs : microtubule-associated proteins
 MARK4 : microtubule associated protein affinity regulating kinase 4
 Mchr1 : melanin concentrating hormone receptor 1
 MDCK : madin-darby canine kidney
 MEFs : mouse embryonic fibroblasts
 MKS : Meckel syndrome
 miRNA : micro ARN
 MRCK : Myotonic related Cdc42-binding kinase
 Nde1 : nuclear distribution gene E homologue 1
 Nesprine : Nuclear Envelope Spectrin repeat proteins
 NIMA : Never-In-Mitosis A
 nM : nano molaire
 NK : natural killer
 NOTO : Notochord homeobox
 NPHP : nephronophtisis
 NuMA : nuclear mitotic apparatus protein
 OFD1 : oral-facial-digital syndrome 1
 ODF2 : outer dense fiber 2 ou cenexin
 OFD : orofaciadigital syndrome
 Orpk : Oak Ridge Polycystic Kidney
 PAR : partitioning defective
 Patched1 : Ptch1
 PCM : Peri Centriolar Material 1
 PKD2 : polycystic kidney 2
 PKHD1 : polycystic kidney and hepatic disease 1
 PC1 : polycystines 1
 PC2 : polycystines
 PCM : pericentriolar matrix
 PCP : Planar Cell Polarity
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor
 PtdIns(4,5)P₂ : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
 PPC : pericentrosomal preciliary compartment
 Ptk : male rat kangaroo kidney epithelial cells
 RFX : regulatory factor X
 SCLT1 : Sodium channel and clathrin linker 1
 Sstr3 : somatostatin receptor type 3
 siARN : small interfering RNA
 SLS : Senior Loken syndrome
 Smo : Smoothened
 SNAP29 : Synaptosomal-associated protein 29
 SUN : Sad1-UNC84

TAN lines : transmembrane actin-associated nuclear
TCR : T cell receptor
TIPS : microtubules plus-end tracking proteins
TRAPII : transport protein particle II
ttbk2 : Tau tubulin kinase 2
TULP3 : Tubby like protein 3
TuRC : Tubulin ring complex

Résumé

Le cil primaire, véritable organite sensoriel cellulaire est présent à la surface de la plupart des cellules de mammifères en quiescence. Truffé de récepteurs à sa membrane, le cil capte les signaux mécaniques et chimiques, jouant ainsi un rôle clé dans de nombreux processus développementaux et physiologiques. Un défaut de structure et/ou de fonction du cil est à l'origine de cancérogénèse et de pathologies humaines appelées ciliopathies.

Le cil primaire est ancré à la membrane plasmique grâce au corps basal, structure dérivée du centriole père et connectée aux trois réseaux du cytosquelette. La formation du cil primaire nécessite une succession d'étapes cytoplasmiques hautement régulées. Elle débute par la maturation du centriole père en corps basal. Cette étape nécessite le recrutement de protéines spécifiques au centriole père permettant l'association avec une vésicule ciliaire à l'extrémité distale du centriole père. Ce complexe migre et vient s'ancrer à la membrane apicale déclenchant la nucléation de microtubules pour la formation de la partie externe du cil, ou axonème. En parallèle, la ciliogénèse nécessite un remodelage important du cytosquelette d'actine ainsi qu'un trafic de vésicules orienté vers la base du cil. Si la plupart des étapes sont bien caractérisées, celle concernant la migration du corps basal ainsi que la contribution du cytosquelette reste mal comprise.

Afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la migration du corps basal lors de la ciliogénèse, nous avons développé un système expérimental basé sur l'utilisation de micro-patrons adhésifs recouverts de fibronectine. Cette technologie comporte de nombreux avantages. Elle permet le contrôle de l'étalement de la cellule inhérent à la surface imposée par la matrice extracellulaire régulant ainsi l'organisation du cytosquelette ainsi que le positionnement des organelles subcellulaires. Par ailleurs, le volume cellulaire induit par le confinement spatial facilite l'observation de la position du centrosome en z au cours du temps, indispensable pour l'étude de chaque étape de la ciliogénèse cytoplasmique.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la forme et l'architecture du cytosquelette d'actine qui en dépend sont des régulateurs majeurs du processus ciliogénique. Les cellules confinées spatialement et sevrées 24h sur des petits disques développent un réseau branché au niveau de leur surface apicale nécessaire à la croissance du cil primaire. A l'inverse, les cellules étalées sur des grands disques sont beaucoup plus contractées. Elles développent d'importantes fibres de stress sur leur surface ventrale. Le centrosome reste sous le noyau et le niveau de contraction empêche l'assemblage du cil. Le niveau de contractilité module donc la formation du réseau d'actine apicale qui contrôle en retour le mouvement du corps basal et l'élongation du cil.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la dynamique du cytosquelette d'actine et de microtubules durant l'étape de migration du corps basal c'est à dire juste après la privation de sérum. Nos résultats indiquent que la migration nécessite une augmentation transitoire de la stabilité des microtubules concomitante avec une augmentation de la contractilité des filaments d'actine. Un crible basé sur l'ARN interférence nous a permis d'identifier des gènes impliqués dans le processus de migration dont CEP164, contribuant à l'ancrage du centriole père à la vésicule ciliaire. Les cellules déficientes en CEP164 montrent un défaut de réorganisation du cytosquelette expliquant l'inhibition du transport du corps basal vers la membrane apicale.

L'ensemble des résultats nous permet d'avancer dans la compréhension des conditions requises pour le mouvement du corps basal vers la membrane apicale. Celui-ci nécessite à la fois un remodelage significatif du cytosquelette en constant dialogue ainsi qu'une interaction avec certains composants ciliaires nécessaires à la formation du cil primaire.

Abstract

The primary cilium is a sensory organelle present on the surface of most quiescent cells. It possesses numerous receptors on its surface and is responsible for transducing biochemical and mechanical signals to the interior of the cell and plays important roles during development and in homeostasis. Defects in primary cilium assembly are the underlying cause of a group of pleiotropic diseases referred to as ciliopathies.

The primary cilium is anchored to the plasma membrane through the basal body which is derived from the mother centriole and is connected to three networks of the cytoskeleton. Primary cilium formation is a highly regulated and multi-step process that begins with the maturation of the centriole mother into basal body in the cytoplasm of the cell. One of the first steps of primary cilium assembly is the recruitment of specific proteins to the mother centriole to initiate the formation of a ciliary vesicle at the distal end of the mother centriole. Once formed, the mother centriole migrates to and is anchored to the apical membrane, triggering the elongation of microtubules from the distal end of the mother centriole to form the outer part of primary cilium, or axoneme. In order for this to occur, significant remodeling of the actin cytoskeleton and direct trafficking of vesicles to the base of the cilium is required. While much progress has been made in characterizing the initial steps of primary ciliogenesis, how the basal body migrates to the plasma membrane is not fully understood.

To gain a better understanding of the mechanisms involved in the migration of basal body during ciliogenesis, we developed an experimental system based on the use of adhesive micro-patterns coated with fibronectin. This technology has many advantages. It enables the control of the cell spreading which is imposed by the size of the adhesive area and, in turn, the regulation of cytoskeletal organization and the positioning of subcellular organelles. Furthermore, this technique enables the cell volume induced by the spatial confinement, to be controlled, facilitating the observation and measurement of the centrosome's position in z throughout the primary ciliogenesis process.

First, we demonstrated that the shape and architecture of the actin cytoskeleton are major regulators of primary ciliogenesis. Cells spatially confined and starved for 24h on small discoidal micropattern develop an apical web like actin network necessary for the primary cilium growth. In contrast, cells plated on large discs are much more contracted and they develop significant stress fibers on their ventral surface. In this situation, the centrosome remains below the nucleus and the level of contraction prevents the assembly of a primary cilium. The level of contractility therefore modulates the formation of apical actin network that in turn controls the movement of the basal body and the cilium elongation.

Secondly, we studied actin cytoskeleton and microtubule reorganization during the basal body migration step that occurred just after serum starvation. Our results indicate that migration requires a transient increase in the stability of microtubules, concomitant with an increase in contractility of actin filaments. By RNA interference screening, we have identified genes involved in the migration process including CEP164, which has previously been shown to participate in the anchoring of the ciliary vesicle to the mother centriole. CEP164-deficient cells were found to have defects in cytoskeletal reorganization thereby explaining why basal body transport to the plasma membrane was blocked in these cells.

Altogether, these results enable our understanding of how basal body movement to the apical membrane is driven. This requires both significant remodeling and crosstalk between the actin and microtubule cytoskeleton and interaction with ciliary components necessary for the formation of a primary cilium.